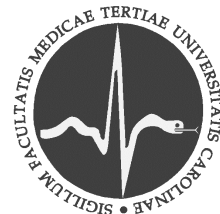




UNIVERZITA KARLOVA  
V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

---



Školící pracoviště: Mikrobiologický ústav AV ČR  
Středisko sekvenování DNA  
Vídeňská 1083  
142 20 Praha 4-Krč

**Martina Poubová**

**Klonování, detekce a analýza shluku genů  
pro syntézu antibiotika anthramycinu.**

*Cloning, detection and analysis of the gene  
cluster coding synthesis of the antibiotic  
Anthramycin.*

*Diplomová práce*

Praha, leden 2007

Autor práce: Martina Poubová

Studijní program: Všeobecné lékařství

Vedoucí práce: **prof. MUDr. Milena Černá, CSc.,**

**Jürgen Felsberg, CSc.**

Pracoviště vedoucího práce: **Katedra preventivního lékařství 3. LF;**

**Středisko sekvenování DNA - MBÚ AV ČR**

Datum a rok obhajoby: 1.února 2007

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 1.ledna 2007

Martina Poubová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli Jürgenu Felsbergovi, CSc. za laskavý a trpělivý přístup a také za to, že se uvolil učit mě veškerou molekulární biologii od úplného začátku. Dále kolegům z MBÚ: Mgr. Markétě Koběrské, Mgr. Daně Ulanové, a Ing. Markétě Jelínkové za odbornou pomoc.

Dále bych ráda poděkovala prof. MUDr. M. Černé za velkou vstřícnost a cenné připomínky a doc. MUDr. B. Svobodovi, CSc., děkanovi 3.LF UK za to, že mi přijetím na 3. lékařskou fakultu umožnil tuto práci napsat.

Za povzbuzení, rady a neuvěřitelnou trpělivost děkuji své rodině.

<b>SOUHRN.....</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>8</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
1.1. CHARAKTERISTIKA ANTIBIOTIK.....	11
1.1.1. HISTORICKÝ VÝVOJ.....	11
1.1.2. SOUČASNÝ VÝZKUM .....	11
1.1.3. PRODUCENTI ANTIBIOTIK .....	12
1.1.4. ANTIBIOTIKA JAKO SEKUNDÁRNÍ METABOLITY .....	12
1.1.5. ANTIBIOTICKÁ TERAPIE NÁDORŮ .....	12
1.1.6. MOŽNOSTI V ANTIBIOTICKÉ TERAPII TROPICKÉ MALÁRIE.....	13
1.2. PYRROLOBENZODIAZEPINY A ANTHRAMYCIN .....	13
1.2.1. ANTHRAMYCIN .....	13
1.2.2. DALŠÍ PYRROLOBENZODIAZEPINY .....	14
1.2.3. UŽITÍ PYRROLOBENZODIAZEPINŮ .....	15
1.2.4. STRUKTURA ANTHRAMYCINŮ .....	16
1.2.5. REAKCE ANTHRAMYCINU S DNA .....	16
1.3. PRODUCENT ANTHRAMYCINU – <i>STREPTOMYCES REFUINEUS</i> .....	17
1.3.1. ROD STREPTOMYCES .....	17
1.3.2. TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ.....	17
1.3.3. PRODUCENT ANTHRAMYCINU: <i>STREPTOMYCES REFUINEUS</i> VAR <i>THERMOTOLERANS</i> .....	18
1.3.4. <i>STREPTOMYCES REFUINEUS</i> VAR. <i>THERMOTOLERANS</i> A REZISTENCE NA ANTHRAMYCIN .....	18
1.4. MOŽNOSTI MODIFIKACE LINKOSAMIDOVÝCH A ANTHRAMYCINOVÝCH ANTIBIOTIK A JEJICH UŽITÍ V LÉKAŘSKÉ PRAXI .....	18
1.4.1. DERIVÁTY ANTHRAMYCINU .....	19
1.4.2. DERIVÁTY LINKOMYCINU .....	19
1.4.2.1. ANTIMALARICKÁ AKTIVITA KLINDAMYCINU A JEHO DERIVÁTŮ.....	21
1.4.2.1.1. TERAPIE TROPICKÉ MALÁRIE ( <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> ) KLINDAMYCINEM 21	
1.4.2.1.2. MONOTERAPIE TROPICKÉ MALÁRIE KLINDAMYCINEM.....	22
1.4.2.1.3. KOMBINOVANÁ TERAPIE TROPICKÉ MALÁRIE S UŽITÍM KLINDAMYCINU .....	22
1.5. VÝZKUMNÝ PROJEKT.....	23
<b>2. MATERIÁLY A METODIKA .....</b>	<b>25</b>
2.1. MATERIÁLY .....	25
2.1.1. KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	25
2.1.2. BAKTERIÁLNÍ KMENY <i>E. COLI</i> .....	28
2.1.3. BAKTERIÁLNÍ KMENY R. <i>STREPTOMYCES</i> .....	28
2.2. METODY .....	31
2.2.1. KULTIVACE A UCHOVÁVÁNÍ KMENŮ .....	31

2.2.1.1.	KULTIVACE <i>E. COLI</i> .....	31
2.2.1.2.	KULTIVACE <i>STREPTOMYCES REFUINEUS</i> VAR. <i>THERMOTOLERANS</i> .....	31
2.2.1.3.	KONZERVACE KMENŮ <i>E. COLI</i> .....	31
2.2.1.4.	PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK .....	31
2.2.2.	IZOLACE CHROMOZOMÁLNÍ DNA ZE <i>STREPTOMYCES REFUINEUS</i> VAR. <i>THERMOTOLERANS</i> .....	32
2.2.3.	IZOLACE PLAZMIDOVÉ DNA Z <i>E. COLI</i> .....	33
2.2.4.	ANALÝZA A ÚPRAVY DNA .....	33
2.2.4.1.	STANOVENÍ KONCENTRACE A KVALITY DNA.....	33
2.2.4.2.	ŠTĚPENÍ DNA RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEÁZAMI .....	34
2.2.4.3.	DEFOSFORYLACE VEKTORU POMOCÍ HOVĚŽÍ ALKALICKÉ FOSFATÁZY (CIP) ...	34
2.2.4.4.	LIGACE FRAGMENTŮ PLAZMIDOVÉ DNA .....	34
2.2.4.5.	ELEKTROFORETICKÁ ANALÝZA DNA.....	35
2.2.4.6.	ODHAD VELIKOSTI A KONCENTRACE FRAGMENTŮ PLAZMIDOVÉ DNA .....	35
2.2.4.7.	EXTRAKCE DNA FENOLEM .....	35
2.2.4.8.	PURIFIKACE DS DNA Z PCR.....	36
2.2.4.9.	VYTVOŘENÍ GENOMOVÉ KNIHOVNY .....	36
2.2.4.10.	HYBRIDIZACE .....	37
2.2.5.	GENETICKÉ PŘENOSY .....	38
2.2.5.1.	TRANSFORMACE <i>E. COLI</i> PLAZMIDOVOU DNA (PODLE HANAHANA, 1985) .....	38
2.2.5.2.	IDENTIFIKACE KLONŮ S REKOMBINANTNÍMI PLAZMIDY ALFA-KOMPLEMENTACÍ.....	38
2.2.6.	PCR – POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE .....	39
2.2.7.	SEKVENOVÁNÍ.....	39
3.	VÝSLEDKY .....	40
3.1.	TEST KULTIVACE.....	40
3.2.	MIKROSKOPICKÉ ZOBRAZENÍ BUNĚK A KOLONIÍ <i>STREPTOMYCES REFUINEUS</i> VAR. <i>THERMOTOLERANS</i> .....	42
3.2.1.	ELEKTRONMIKROSKOPICKÝ OBRAZ RŮZNÝCH RŮSTOVÝCH FÁZÍ <i>STREPTOMYCES REFUINEUS</i> VAR. <i>THERMOTOLERANS</i> .(OBR.9).....	42
3.2.2.	BUŇKY SUBMERZNÍ KULTURY <i>STREPTOMYCES REFUINEUS</i> VAR. <i>THERMOTOLERANS</i> V OPTICKÉM MIKROSKOPU.(OBR.10) .....	44
3.3.	IZOLACE CHROMOZOMÁLNÍ DNA Z <i>STREPTOMYCES REFUINEUS</i> VAR. <i>THERMOTOLERANS</i> .....	45
3.4.	PŘÍPRAVA GENOMOVÉ KNIHOVNY .....	45
3.5.	HYBRIDIZACE.....	46
3.6.	RESTRIKČNÍ ANALÝZA A HYBRIDIZACE SE SONDOU ANB W.....	47
3.7.	SEKVENOVÁNÍ.....	48
4.	DISKUSE.....	49
5.	ZÁVĚR .....	54
	POUŽITÁ LITERATURA.....	55

## **Souhrn**

Cílem práce bylo najít, izolovat a sekvenovat shluk genů kódující syntézu anthramycinu, antibiotika ze skupiny pyrrolobenzodiazepinů, jehož producentem je *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans*.

Pyrrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepiny jsou skupinou přirozeně se vyskytujících antibiotik s protinádorovým účinkem. Jsou to molekuly, které se kovalentně vážou do molekuly DNA a tím dochází k zablokování transkripce.

Ačkoli anthramycin minimálně ovlivňuje kostní dřeň, nebyl uveden do klinické praxe jako protinádorové antibiotikum z důvodu vysoké kardiotoxicity.

Lepší účinky a dobré klinické vlastnosti se očekávají od nových syntetických analogů a to jak ve smyslu protinádorových antibiotik, tak pro produkci antimikrobních látek a antimalarik.

Doposud úspěšným antibiotikem z příbuzné rodiny antibiotik, linkosamidů, byl klindamycin s antibakteriálním i antiparazitickým účinkem.

Znalost genového pozadí vzniku těchto látek umožňuje modifikaci současně užívaných látek a následnou finančně méně nákladnou produkci účinnějších a bezpečnějších látek.

Pomocí molekulárně biologických metod byla izolována část chromozomální DNA producenta *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* obsahující kompletní shluk genů pro biosyntézu anthramycinu.

## **Summary**

This work aimed to find, isolate and sequence the anthramycin gene cluster. The antibiotic Anthramycin is being produced by the microorganism *Streptomyces refuineus* and it belongs to a Pyrrolobenzodiazepine family.

The Pyrrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepines are a family of naturally occurring antitumour antibiotics. They exert their antitumour activity by covalently binding to the minor groove of the DNA and they are thus blocking the transcription. In spite of the fact that they exhibit minimal bone marrow depression they haven't been progressed clinically due to severe cardiotoxicity.

The most successful antibiotic with antibacterial and antiparasitic activity proceeding from the Pyrrolobenzodiazepine family was Clindamycin.

The knowledge of genetic baseline of the pyrrolobenzodiazepines biosynthetic pathway allows the modification of the existing compounds, which may lead to production of more safe and efficacious agents.

The application of molecular biological methods allowed the isolation of total DNA derived from *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* containing the whole Anthramycin gene cluster.

New synthetic analogs of pyrrolobenzodiazepines are expected to be more efficient in antitumour/antimicrobial and antimalarial treatment.



## 1. Úvod

Tato práce s názvem „Klonování, detekce a analýza shluku genů pro antitumorové antibiotikum Anthramycin“ byla provedena pod vedením Dr. Jürgena Felsberga v Mikrobiologickém ústavu AV ČR. Byla vypracována v letech 2004 – 2006 v rámci grantového projektu „Biosyntéza anthramycinových a linkosamidových antibiotik, zdroj pro nové hybridní látky s antibakteriálními, antimalarickými a protinádorovými účinky“, GAČR č. 204/04/0801, jehož nositelem je Ing. Jiřího Janata, CSc. z Laboratoře fyziologie strukturálního metabolismu Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky.

Tato diplomová práce má multidisciplinární charakter. Spojuje dohromady poznatky z několika biomedicínských oborů.

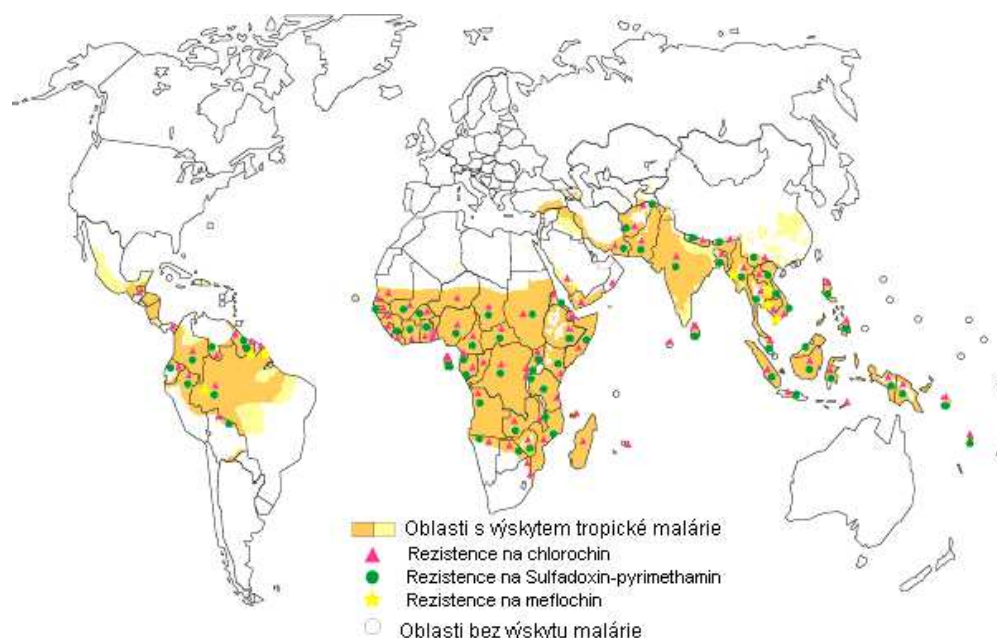
Vzhledem k tomu, že nukleové kyseliny jsou základní osou, která spojuje vše živé, je metodika práce s nukleovými kyselinami stejná jak pro vědce, tak pro toxikology, imunology a molekulárně biologické laboratoře. V lékařství jsou tyto obory využívány především pro diagnostiku infekčních a dědičných onemocnění.

V mé práci byly metody molekulární biologie využity při hledání dalších možností biosyntézy antibiotik. Zde jsem pochopila kolik času, úsilí a prostředků stojí preklinická fáze vývoje léčiv. Uvádí se, že z preklinického vývoje projde do I. fáze klinického testování 71% z potenciálních léčivých přípravků, z nich pouze 1% je nakonec uvedeno na trh (Mészáros, 2006 - ustní sdělení). Zbytek se zastaví v klinických studiích, na nezájmu manažerů farmaceutických firem a na saturaci trhu jednotlivých států. Přesto tímto sítím prochází dost generik na to, aby kliničtí lékaři měli své pacienty čím léčit.

Snaha minimalizovat ohrožení pacientů závažnými nežádoucími účinky vede k vývoji hybridních sloučenin a snaha co nejvíce snížit náklady a tím zlepšit pozici farmak na trhu, vede k hledání alternativních cest produkce látek. Za zdroje nových léčiv jsou obecně považovány tyto čtyři: 1) empirická medicína (přírodní léčiva), 2) kazuistiky spolu s farmakoepidemiologií, 3) ozřejmení biochemických mechanismů a etiologie nemocí, 4) chemické obměny známých struktur, kde má místo i tato práce.

Anthramycin, jehož se tato práce týká a bude popsán podrobně v textu, patří do skupiny antibiotik, která mohou napomoci k vývoji látek s cytostatickým účinkem a popř. přispět k vývoji látek s vhodnými vlastnostmi v boji proti jednomu ze světově nejrozšířenějších infekčních onemocnění – malárii. WHO uvádí 350-500 milionů

nově vzniklých onemocnění malárií ročně a potřebu nových farmak ozřejmuje i tato mapa z roku 2004 ukazující vznik rezistence plasmodií k dosud používaným léčivům (Obr.1). Vlastnosti nových hybridních látek by měly vést ke zvýšení terapeutického účinku, snížení nežádoucích účinků a k prevenci vzniku nových rezistencí.



Obr. 1 Rezistence *Plasmodium falciparum* na užívaná léčiva. Z různých studií do r. 2004. (převzato z <http://www.fda.gov/Cber/blood/malaria071206sk.htm>)

Produkce léčivých přípravků bakteriálními kmeny, do nichž byl vpraven gen pro biosyntézu určité látky, je cestou, která je finančně méně náročná než syntéza cestou chemickou. Jestliže je znám projev jednotlivých částí chemické struktury farmaka *in vivo*, je možné sestavit farmakum s výbornými farmakologickými vlastnostmi. A poznáme-li, které geny kódují tyto funkční celky, je možno je nalézt u příbuzných přirozených producentů, skombinovat a vpravit do průmyslového producenta, pak je zde naděje na ekonomicky únosnou biologickou produkci velmi účinné látky s minimem nežádoucích účinků.

Tato diplomová práce je malým kamínkem v této mozaice.

## **1.1. Charakteristika antibiotik**

Antibiotika jsou organické molekuly různé chemické struktury produkované mikroorganismy, rostlinami i živočichy, které vykazují specifický inhibiční účinek na určitý životní děj některých jiných mikroorganismů (Kaprálek, 1999).

### **1.1.1. Historický vývoj**

Lékařský význam antibiotik spočívá v antibakteriální chemoterapii, jejíž začátek se datuje na konec 19. století. Rozumí se jí léčebné použití přípravků, které mají schopnost ve vnitřním prostředí buď zastavit růst, nebo usmrtit převážnou část populace mikroorganismu, který vyvolal infekční nemoc, a tak napomoci k vyléčení nebo zkrácení průběhu infekční nemoci nebo předejití možným komplikacím (Havlík, 1990).

Rozvoj antimikrobní léčby spadá pak do období druhé světové války, kdy Britové a Američané využili Flemingův objev penicilinu a po vypracování technologie výroby začali s léčbou tímto antibiotikem. Po tomto prvním antibiotiku byla identifikována řada dalších, jejichž hlavními producenty jsou půdní mikroorganismy jako např. řád *Aktinomycetales*. Antibiotika byla definitivně zavedena do léčebné praxe ve čtyřicátých a padesátých letech, což znamenalo významný obrat v terapii infekčních nemocí (Bednář, 1999). Postupně se k terapii infekčních onemocnění přidaly další možnosti uplatnění antibiotik v protinádorové a antiparazitární terapii.

### **1.1.2. Současný výzkum**

V současné době bylo z přírody izolováno několik tisíc látek s biologickou aktivitou. Hrubým odhadem lze říci, že ročně je zkoumáno asi 100 000 mikroorganismů kvůli přítomnosti nebo nepřítomnosti biologicky aktivních látek. (Baltz, 2006 – ustní sdělení)

Potřeba objevu nových antibiotik vyplývá z rizika výskytu či vzniku rezistentních kmenů patogenních organismů. Vyhledáváním a výzkumem nových antibiotik se zabývají především velké farmaceutické společnosti. Příprava nových antibiotik a jejich zavedení do klinické praxe vyžaduje spolupráci vědců z různých oborů.

Přírodní produkty syntetizované mikroorganismy byly vždy největším zdrojem antimikrobiálních přípravků.

### **1.1.3. Producenti antibiotik**

Hlavními producenty antibiotik jsou vláknité mikroorganismy řádu Actinomycetales, zejména příslušníci rodu Streptomyces. Mikroorganismy řádu Actinomycetales jsou producenty přibližně dvou třetin známých antibiotik produkovaných mikroorganismy a z toho téměř 80% náleží rodu Streptomyces. Jsou to jak léčiva používaná v terapii infekčních onemocnění jako erythromycin, gentamicin, linkomycin, neomycin, tetracyklin, vankomycin, klavulanová kyselina apod., tak léčiva používaná pro imunosupresi (Hopwood, 2000) (např. FK506). Všechna v současnosti klinicky využívaná protinádorová antibiotika jsou také produkty různých kmenů půdních organismů rodu Streptomyces (patří mezi ně adriamycin, bleomycin, tobramycin, fosfomycin, teichoplanin, a mnoho dalších) (Katzung, 2006).

Z přirozeně produkovaných biocidních látek vychází více než 100 000 semisyntetických a syntetických derivátů, avšak v praxi se z nich používá pouze asi 160 antibiotik (Baltz, 1998).

### **1.1.4. Antibiotika jako sekundární metabolity**

Antibiotika jsou sekundárními metabolity, což znamená produkty mikroorganismů (nebo rostlin), které nejsou nezbytné pro základní metabolické procesy, jako je reprodukce nebo růst organismu (Bennett et al., 1989), ačkoliv mohou bazální metabolismus ovlivňovat např. jako signální molekuly pro kontrolu metabolismu. Další funkcí sekundárních metabolitů může být suprese soupeřících mikroorganismů v prostředí. Takto mají producenti antibiotik výhodu nad dalšími mikroorganismy v boji s o živiny. Tato vlastnost antibiotik je pro medicínu bezesporu nejdůležitější, ačkoli je zřejmě pouze jednou z mnoha.

V produkci sekundárních metabolitů platí, že jeden organismus může produkovat různé látky s rozlišnou biologickou aktivitou a naopak, jedna látka může být produkována různými mikroorganismy.

V genomu se geny pro propyrrlobenzodiazepinová antibiotika, jakož i všechny ostatní sekundární metabolity, typicky vyskytují pohromadě, ve shlucích (clusterech), což v mnohém usnadňuje jejich výzkum.

### **1.1.5. Antibiotická terapie nádorů**

Výzkum antimikrobiálních produktů rovněž vedl k objevení řady růstových inhibitorů, které lze klinicky využít při protinádorové terapii. Mnoho z těchto antibiotik se váže na DNA pomocí interkalace mezi specifické baze a blokuje syntézu nové RNA nebo DNA (případně obou), způsobuje štěpení řetězce DNA a interferuje s buněčnou replikací (Katzung, 2006 a

Rosenkranz, 1973). Příkladem mohou být antibiotika z rodiny anthracyklinů – doxorubicin, daunorubicin, mitomycin, bleomycin, aktinomycin apod.

### **1.1.6. Možnosti v antibiotické terapii tropické malárie**

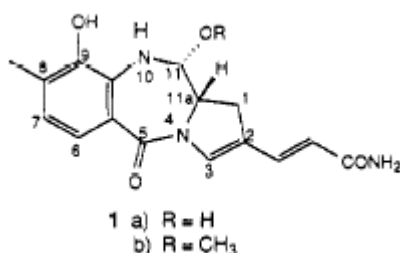
Pro terapii nejtěžší formy malárie, jejíž původcem je *Plasmodium falciparum*, začala být z důvodu rychle se vyvíjející rezistence zkoušena a užívána různá generika. Jedním z úspěšných generik bylo linkosamidové antibiotikum, klindamycin. Podrobně se o užití klindamycinu zmíním v kapitole 1.4.2., pojednávající o derivátech linkosamidů.

## **1.2. Pyrrolobenzodiazepiny a anthramycin**

Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepiny (PBDs) jsou rodinou přirozeně se vyskytujících protinádorových antibiotik izolovaných ze rodu *Streptomyces*.

### **1.2.1. Anthramycin**

Prvním objeveným členem skupiny pyrrolobenzodiazepinů byl anthramycin (Obr.2).



Obr. 2: Struktura anthramycinu (Peña *et al.*, 1989)

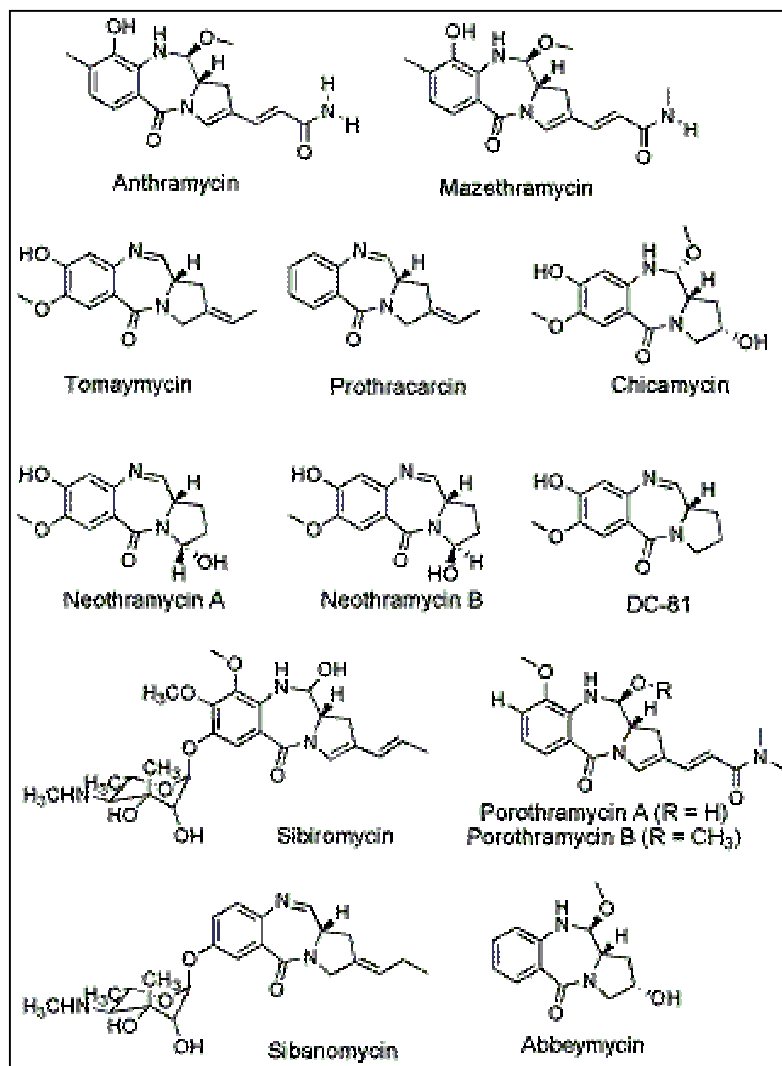
V roce 1965 Leimgruber a jeho spolupracovníci izolovali antibiotikum z termofilní aktinomycety *Streptomyces refuineus* (Leimgruber, 1965). Již předtím bylo zjištěno, že tento

mikroorganismus produkuje do fermentačního média látku, která vykazuje protinádorovou aktivitu (Tendler, Korman, 1963).

Leimgruber charakterizoval toto antibiotikum jako cyklickou strukturu skládající se z pyrrolového kruhu, benzenového jádra a diazepinového kruhu s C – kruhovou substitucí, odvozené od anthranilové kyseliny. Antibiotikum pojmenoval anthramycin a novou skupinu antitumorových antibiotik jako pyrrolobenzodiazepiny (Leimgruber, 1965).

### **1.2.2. Další pyrrolobenzodiazepiny**

Vzhledem k prokázané protinádorové aktivitě byla snaha získat další jak syntetické, tak přírodní látky. V roce 1969 Gause objevil sibiromycin z producenta *Streptosporangium sibiricum* (Gause, 1969) a dále v roce 1972 Arima a spol. publikovali zprávu o izolaci tomaymycinu ze *Streptomyces achromogenes* var. *tomaymyceticus* (Arima, 1972). Roku 1976 Takeuchi a spol. izolovali a charakterizovali neothramycin A a B (Takeuchi *et al.*, 1976), o 4 roky později byl objeven mezethramycin, který je strukturně podobný anthramycinu. V 80. letech se objevila další antibiotika: prothracarcin (Shimizu *et al.*, 1982), chicamycin (Konishi *et al.*, 1984), abbeymycin (Hochlowski *et al.*, 1987), porothramycin (Tsunakawa *et al.*, 1988), sibanomycin a DC-102 (Hara *et al.*, 1988)(obr.3).



Obr.3:Přehled pyrrolobenzodiazepinových antibiotik

(převzato z <http://freewebs.com/pyrrolobenzodiazepines/pyrrolobenzodiazepines.htm>)

### 1.2.3. Užití pyrrolobenzodiazepinů

Pyrrolobenzodiazepiny jsou účinná protinádorová antibiotika. Výhodou je, že působí minimální depresi kostní dřeně. Vazba do malého žlábků DNA má za následek pouze malé poškození helixu, nicméně inhibuje syntézu nukleové kyseliny a způsobuje buď jednovláknové nebo dvouvláknové zlomy v helixu. Má se za to, že inhibuje aktivitu některých restričních endonukleáz.

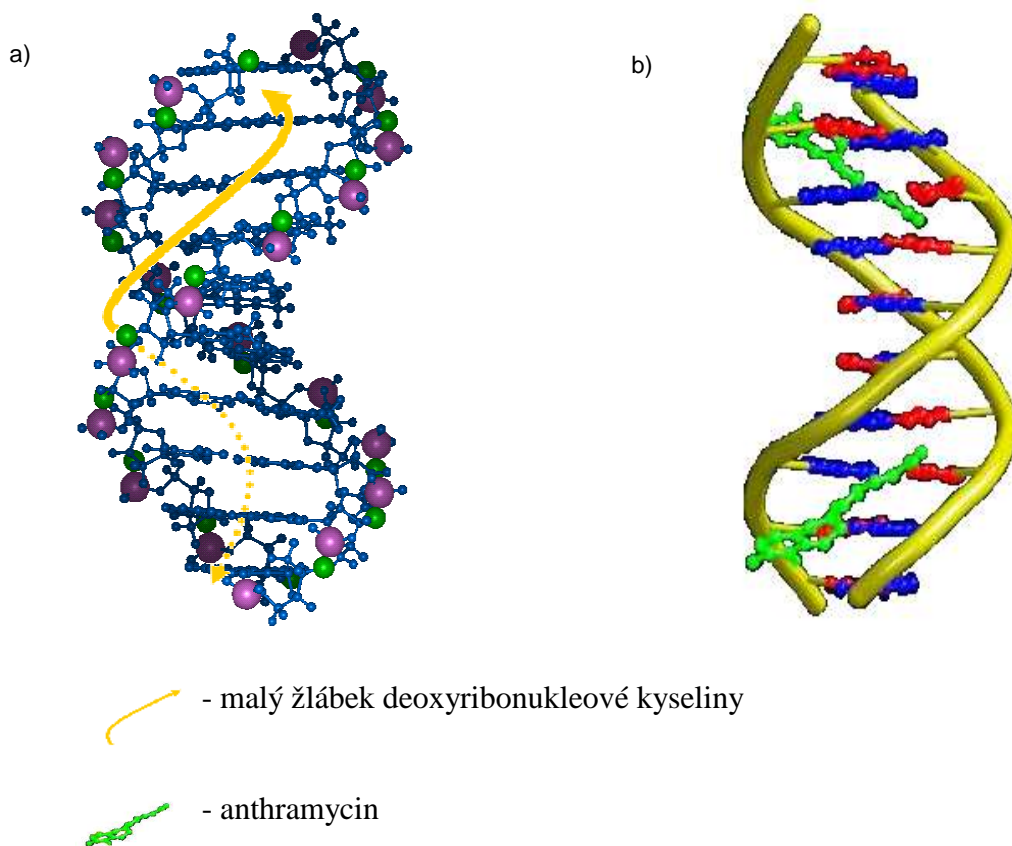
#### 1.2.4. Struktura anthramycinů

Anthramyciny jsou tricyklické molekuly obsahující chirální centrum (na C11a pozici), které umožňuje pravostrannou rotaci, tzn. izohelikální tvar, který zajistí perfektní kompatibilitu s malým žlábkem molekuly DNA.

Vodíkové vazby na dně a po stranách malého žlábků jsou příčinou preference vazby v AGA sekvenci.

#### 1.2.5. Reakce anthramycinu s DNA

Rentgenová analýza krystalové struktury ukazuje vazbu anthramycinu na kovalentně navázaného na deset párů bazí v dvoušroubovici C-C-A-A-C-G-T-T-G-G. Elektrofilní imino/karboxylaminová skupina (na N10-C11 pozici) umožňuje kovalentní vazbu na guanin v N2 pozici (obr.5) (Kopka et al., 1994).



Obr. 5: Schéma vazby anthramycinu do malého žlábků DNA (*upraveno podle Kopka et al., 1994*)



### **1.3. Producent anthramycinu – *Streptomyces refuineus***

#### **1.3.1. Rod *Streptomyces***

Členy rodu *Streptomyces* jsou grampozitivní vláknité bakterie, které lze v přírodě nalézt téměř ve všech biotopech. Jedná se převážně o půdní saprofytické bakterie, ale najdou se mezi nimi i některé patogenní kmeny (Kieser *et al.*, 2000), způsobující onemocnění charakteru specifických zánětů, jako je mycetom (chronické granulomatózní ložisko v podkoží způsobené *Streptomyces somalensis*, popř. *Streptomyces ipomoe* a *Streptomyces scabies*). Nejbližšími patogenními příbuznými jsou dále rody *Mycobacterium* a *Nocardia*.

Schopnost rodu *Streptomyces* kolonizovat půdu je usnadňována růstem v podobě vegetativních hyfových vláken, která se v nepříznivých podmínkách mohou diferencovat ve spory. Zatímco myceliální fáze je senzitivní na vysušení, spory jsou odolné k nízké dostupnosti živin a vody. (Hopwood, 2000)

Genom streptomycét, patřící mezi největší bakteriální genomy, je ve velké většině případů lineární, zhruba 8 Mbp velký (Line *et al.*, 1993; Leblond *et al.*, 1993; Lezhava *et al.*, 1995), počet genů je přibližně sedm tisíc. DNA se vyznačuje vysokým obsahem G + C párů a velkou četností přestavby částí genomu, tzv. „rearrangements“ (Volf a Altenbuchner, 1998).

#### **1.3.2. Taxonomické zařazení**

Taxonomické zařazení: nadříše: Prokaryota

říše: Bacteria

třída: Actinobacteria

podtřída: Actinobacteridae

řád: Actinomycetales

podřád: Streptomycineae

čeleď: Streptomycetaceae

rod: *Streptomyces*

kmen: *Streptomyces refuineus*

### **1.3.3. Producent anthramycinu: *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans***

*Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* patří mezi termofilní bakterie rodu *Streptomyces*. Na půdách tvoří v závislosti na fázi cyklu nejprve homogenní substrátové mycelium. Následuje tvorba vzdušného mycélia. Na konci životního cyklu se tvoří spóry. Produkce sekundárních metabolitů spadá do pozdější stacionární fáze růstu či fáze morfologické diferenciaci, tato fáze je doprovázena tvorbou pigmentů hnědé barvy.

### **1.3.4. *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* a rezistence na anthramycin**

*Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* je ve stacionární fázi rezistentní k anthramycinu díky nepropustnosti bakteriální stěny. V časně log fázi je jeho růst anthramycinem inhibován. Jiný způsob rezistence (strukturní změny molekuly, modifikace DNA) byl experimentálně vyloučen. Produkce anthramycinu je rovněž závislá na intaktní bakteriální stěně. Bez podmínky neporušené bakteriální stěny nedochází k produkci anthramycinu. Pro ostatní strukturně příbuzná antibiotika – sibiromycin a tomaymycin – je stěna *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* propustná bez závislosti na fázi růstu a jeho růst je těmito antibiotiky inhibován (Rokem, 1981).

Kmen *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* je od r. 2002 patentován firmou Roche.

## **1.4. Možnosti modifikace linkosamidových a anthramycinových antibiotik a jejich užití v lékařské praxi**

Analýza a srovnání shluků genů kódujících biosyntetickou dráhu anthramycinů a linkosamidů je cestou k rozšíření možností modifikace struktury původních látek.

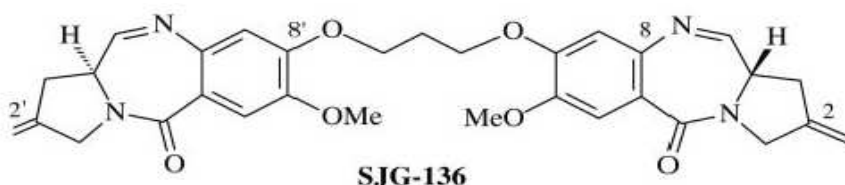
Doposud jsou známé následující, klinicky více či méně úspěšné, modifikace anthramycinů a linkosamidů:

#### 1.4.1. Deriváty anthramycinu

Anthramycin, první z objevených pyrrolobenzodiazepinů, prokázal, kromě nízké aktivity proti Gram-pozitivním bakteriím a zanedbatelné aktivity proti Gram-negativním bakteriím, dobrou účinnost proti mnohým maligním nádorům člověka (Leimgruber et al., 1965). Neprošel však preklinickým testováním pro těžkou kardiotoxicitu (Lubawy, 1980).

Je již známo, že za kardiotoxicitu anthramycinu odpovídá hydroxy -skupina v pozici C9 (Hurley et al., 1977). Zatímco změny na A-kruhu nevedly ke změně vazebné či cytotoxické aktivity (Thurston 1999), substituent v pozici C2 (Gregson, 2000) a stupeň nasycenosti C-kruhu je klíčový pro cytotoxicitu a protinádorovou aktivitu.

Klinicky úspěšným derivátem je pyrrolobenzodiazepinový dimer SJG-136, který je potencionálním cytostatikem v léčbě chronické lymfatické leukémie (B-CLL) (Pepper et al., 2004), (obr. 7)



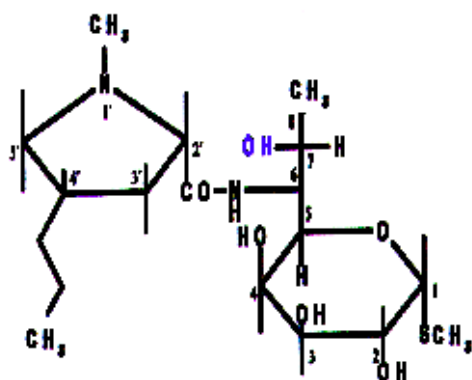
Obr.7. Struktura SGJ-136.

Tento derivát je v současné době v I. fázi klinického testování v USA.

#### 1.4.2. Deriváty linkomycinu

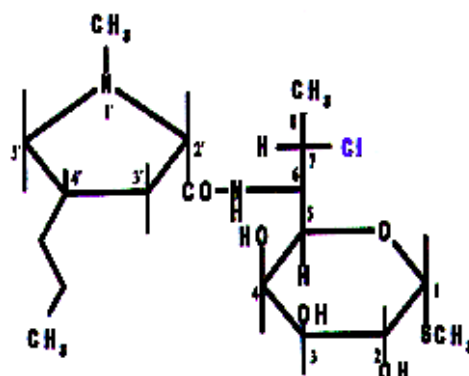
Substitucí hydroxyskupiny atomem chloru na pozici C7 cukerného řetízku linkomycinu vzniklo vysoce účinné antibiotikum s nízkou toxicitou – klindamycin (Birkenmeyer et al., 1965) (Obr.6).

a)



linkomycin

b)



klindamycin

Obr.6: Struktura a) linkomycinu a b) klindamycinu

Do praxe byl klindamycin zaveden jako antimikrobiální přípravek pro terapii hlavně anaerobních infekcí, popřípadě jako alternativa léčby stafylokokových infekcí při přecitlivělosti na penicilin. Později, podaný v kombinaci s pyrimethaminem, se ukázal být účinný v léčbě toxoplasmové encefalitidy u pacientů s AIDS (Gatti, 1998).

Látkou s velmi vysokou antibiotickou účinností je i derivát klindamycinu N-demethylklindamycin (Magerlein *et al.*, 1969), což je v podstatě jeden z metabolitů odpovědných za účinnost antibiotika.

Další z modifikací vedla ke vzniku 4'-alkyl-4'-depropyl-1'-demethylklindamycinu, který je posunem k látce s lepším antiparazitárním účinkem.

Roku 1968 Lewis zjistil, že klindamycin podaný perorálně nebo subkutánně myším infikovaným *Plasmodium berghei* vykazuje antimalarickou aktivitu (na rozdíl od linkomycinu).

	MED (mg/kg)		CD <sub>50</sub> (mg/kg)		CD <sub>100</sub> (mg/kg)	
	podkožně	orálně	podkožně	orálně	Podkožně	orálně
Chlorochin	10	12,5	8,1	14	20	25
Diaminodifenylsulfon	3,12	6,5	25	38	50	100
<b>Linkomycin</b>	> 160	> 400	> 100	> 400	> 160	> 400
1'-demethyl-4'-depropyl-4'-pentyllinkomycin	50	125	> 100	> 250	> 100	> 250
<b>Klindamycin</b>	5,0	12	113	141	160	250
1'-demethyl-1'-ethylklindamycin	> 100	250	> 100	> 250	> 160	> 250
1'-demethyl-4'-depropyl-4'-butyl-1'-ethylklindamycin	8,0	15	57	62	100	150
1'-demethylklindamycin	1,2	3,1	19,0	37	40	50
1'-demethyl-4'-depropyl-4'-pentyklindamycin	0,31	1,6	4,7	12	10	25
1'-demethyl-4'-depropyl-4'-hexylklindamycin	0,6	1,6	6,6	14	20	50

**Tab. 1. Antimalarická aktivita analogů linkomycinu a klindamycinu u myší infikovaných *Plasmodium berghei*. (Magerlein 1977)**

(MED = dávka, při které byl v porovnání s neléčenými kontrolami statisticky významně prodloužen medián doby přežití (ST<sub>50</sub>); CD<sub>50</sub> = medián protektivní dávky; CD<sub>100</sub> = dávka, která ochránila 100 % zvířat, kdy nebyli detekováni žádní parazité).

(převzato z diplomové práce Markéty Koběrské - Cílené zásahy do genu kódujícího *N-demetyllinkomycinmetyltransferázu*, 2002)

Vzhledem k neustále narůstající rezistenci malarických plazmodií k současně užívaným léčivým přípravkům jsou linkosamidová antibiotika vítanou pomocí v boji s malárií.

#### **1.4.2.1. Antimalarická aktivita klindamycinu a jeho derivátů**

Vnásledujících odstavcích uvádím současné poznatky o užití linkosamidů v terapii malárie.

##### **1.4.2.1.1. Terapie tropické malárie (*Plasmodium falciparum*) klindamycinem**

Klinické studie ze 70. a 80. let prokázaly, že použití klindamycinu pro terapii tropické malárie je účinné a bezpečné. (Kremsner, 1990; Kremsner, Graninger, 1992)

In vitro měl klindamycin a jeho metabolity na *Plasmodium falciparum* silný inhibiční efekt (Seaberg, 1984).

Pravděpodobným místem účinku je apikoplast (Fichera, Roos, 1997).

Látka se v parazitech pomalu akumuluje (Geary, *et al.* 1988), což vysvětluje na „dose-response křivkách“ plateau efekt při koncentracích vyšších než 0,01 µg/ml. Relevantní

inhibiční efekt na plazmodia proto může být dosažen až při expozici delší než 3 dny (Seaberg, 1984). To může být také důvodem pomalého nástupu účinku in vivo. (Lell, *et al.*, 2002)

#### **1.4.2.1.2. Monoterapie tropické malárie klindamycinem**

Studie z roku 1975 (Clyde, 1975) ukázala na více než 500 pacientech, kteří dostávali klindamycin v antimalarické monoterapii následující:

- Terapie klindamycinem je efektivní z 98%.
- Musí být podáván minimálně dvakrát denně alespoň 5 dní.
- Je dobře tolerován, nežádoucí účinky jsou mírné, vesměs stejné jako při antibakteriální terapii. Převažují obtíže gastrointerstinálního charakteru, nejčastěji průjemy (u 2 případů prokázán toxin *Clostridium difficile*) (Kremsner, 1988) a dále periorální exantém.

Antimalarická monoterapie klindamycinem není vhodná pro pomalý nástup účinku, což může mít potenciálně fatální důsledky u dětí a imunosuprimovaných dospělých, kdy je nutné co nejrychleji snížit nálož plazmodií. (Lell, *et al.*, 2002)

#### **1.4.2.1.3. Kombinovaná terapie tropické malárie s užitím klindamycinu**

Kombinovaná terapie je založena na užití látek s rychlou eliminací jako prevencí vzniku rezistence plazmodií. (Ramharter, 2003)

- Kombinace chininu s klindamycinem má synergický až aditivní účinek (Rahman, 1997; Restrepo, 1984). Tím se zkracuje doba nutná k podávání léku na 3 dny. Stejný efekt má kombinace tetracyklinu a doxycyklinu, které jsou ovšem na rozdíl od klindamycinu kontraindikovány u dětí a těhotných.
- Kombinace chlorochinu s klindamycinem byla zkoušena z důvodu vysoké rezistence na chlorochin (Kremsner, 1994). Studie prokázaly, že tato kombinace je efektivní a vhodná pro částečně imunodeficientní jedince v oblastech vysokou rezistencí na chlorochin. U plně imunodeficientních pacientů by byla při tří denní terapii nutná příliš vysoké koncentrace chlorochinu. (Lell, *et al.*, 2002, 2002)
- Nadějnou se ukazuje kombinovaná terapie klindamycinem a fosmidomycinem. Kohortová studie na 51 pacientech ve věku 1-14 let se ukázala při dávkách 30 a 10 mg/kg váhy podávaných 3 krát denně jako účinná a bezpečná. Při vysokých dávkách se objevily hematologické obtíže, které byly zhodnoceny

jako nesouvisející s onemocněním. Převážně se jednalo o neutropenii a snížené hladiny hemoglobinu.

Obě látky interferují s různými funkčními jednotkami apikoplastu plazmodia. (Jomaa, 1999; Wiesner, 2003) Krátký biologický poločas klindamycinu i fosmidomycinu navíc snižuje riziko vzniku rezistence. Nevýhodou je, že tato kombinace nepůsobí na plazmodia v sexuální fázi cyklu, což usnadňuje přenos potenciálních rezistentních parazitárních alel do vektoru (komáři r. *Anopheles*) (Borrmann, 2006).

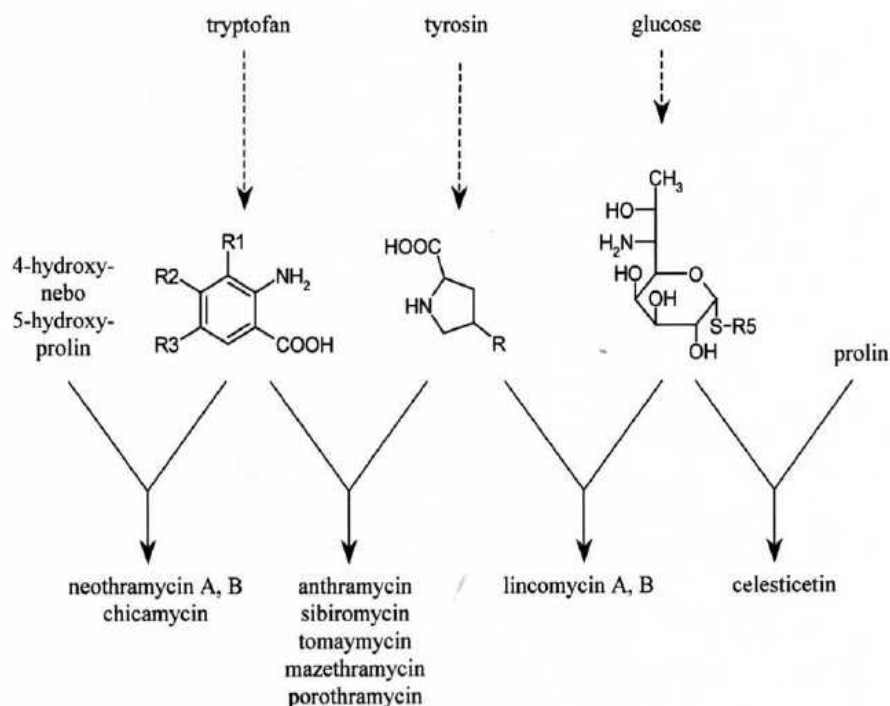
- Další studií byla otevřená randomizovaná studie organizovaná WHO, která proběhla r. 2003 v Africe. Kombinace artesanátu-klindamycinu a chlorochinu-klindamycinu se projevil ve studii jako srovnatelné jak v účinnosti, tak v bezpečnosti. Clearance parazitů byla lehce ve prospěch artesanátu-klindamycinu (Ramharter, 2003).

### **1.5. Výzkumný projekt**

Laboratoř fyziologie strukturálního metabolismu pod vedením Ing. Jiřího Janaty, CSc. se od roku 2003, v rámci grantového projektu GAČR č. 204/04/0801 s názvem „Biosyntéza anthramycinových a linkosamidových antibiotik, zdroj pro nové hybridní látky s účinky antibakteriálními, antimalarickými a protinádorovými“, zabývá studiem vybraných linkomycinových a anthramycinových antibiotik. Cílem je získání kmenů produkujících nové aktivní látky (kombinatoriální biosyntéza, hybridní antibiotika).

Pro poznání funkce genů pro sekundární metabolismus se využívá srovnání sekvencí genových clusterů producentů, kteří mají pro produkci sekundárních metabolitů podobnou biosyntetickou dráhou.

Linkosamidová a anthramycinová antibiotika jsou strukturně i funkčně odlišná, nicméně sdílí část biosyntetické dráhy (Obr. 8).



Obr. 8: Biosyntetický původ stavebních jednotek linkosamidů a anthramycinů.

Výchozím bodem je genový cluster pro syntézu linkomycinu, jehož sekvence je již známá (Spížek *et al.* 1994; Peschke *et al.* 1995).

Osekvenováním genových shluků pro syntézu celesticetinu a anthramycinu (a dalších pyrrolobenzodiazepinů: porothramycinu, sibiromycinu atd.) a jejich porovnáním s již známým linkomycinovým shlukem je naděje na odhalení funkce jednotlivých genů.

Metodou DNA hybridizace byly v genomu *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* NRRL 3143 detekovány tři vybrané geny homologní ke genům pro biosyntézu linkomycinu (*lmbA*, *lmbB2* a *lmbW*). Tyto geny chybí v genomu *Streptomyces caelestis*, producenta celesticetinu.

Dílčím cílem projektu bylo tedy pomocí těchto sond nalézt genový cluster pro biosyntézu anthramycinu a tento cluster pak izolovat a osekvenovat.



## **2. Materiály a metodika**

Pro práci s kmeny *E.coli* jsme se řídili především protokoly Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1987) a Molecular cloning : a laboratory manual (Sambrook *et al.*, 1989). Pro práci s organismy rodu *Streptomyces* jsme postupovali podle knihy Practical Streptomyces Genetics (Hopwood, 2002).

### **2.1. Materiály**

#### **2.1.1. Kultivační média**

##### **LB**

trypton            10g  
yeast extrakt    5g  
NaCl               10g  
doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 1000 ml  
pH        7,2 – 7,4 (neupravováno)  
agar               12g

##### **TYP**

trypton            16g  
yeast extrakt    16g  
NaCl               5g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>           2,5g  
doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 1000 ml  
pH        7,2 – 7,4 (neupravováno)

##### **ISP4 ( medium 547)**

*Roztok I:* (500 ml)

20g rozpustného škrobu opatrně povařit s menším množstvím dest. vody a doplnit do 500 ml.  
Výsledný roztok musí být čirý.

*Roztok II:* (500 ml)

CaCO<sub>3</sub> 2g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g

MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 1g

NaCl 1g

(NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g

roztok stopových prvků 0,5 ml

doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 500 ml

pH 7,0-7,4 (upraveno 5M NaOH)

Smíchat roztok I a II. Dohromady a přidat agar 20g/l.

### **YES**

yeast extrakt 2g

rozoustný škrob 10g

agar 15g

doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 1000 ml

pH 7,3 (upraveno 5M NaOH)

### **YEME (10%, 34%)**

yeast extrakt 3g

pepton 0,5g

malt extrakt 3g

glukóza 10g

(sacharóza 100g, resp. 340g)

doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 1000 ml

### **BG (ISP2)**

yeast extrakt 4g

malt extrakt 10g

CaCO<sub>3</sub> 2g

glucóza 4g

agar 20g

doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 1000 ml

pH 7.2 (upraveno 5M NaOH)

**SS (sporulační médium)** (Hopwood et al., 1985)

yeast extrakt 4g

malt extrakt 10g

glukóza 4g

agar 20g

doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 1000 ml

pH 7.2- 7,4 (upraveno 5M NaOH)

sterilizace; po sterilizaci přidat 10 ml roztoku stopových prvků)

**Roztok stopových prvků** (Hopwood et al., 1985):

ZnCl<sub>2</sub> 40 mg

FeCl<sub>3</sub>x 6 H<sub>2</sub>O 200mg

CuCl<sub>2</sub>x 2 H<sub>2</sub>O 10 mg

MnCl<sub>2</sub>x 4 H<sub>2</sub>O 10 mg

Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>x 10 H<sub>2</sub>O 10 mg

(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 10 mg

doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 1000 ml

sterilizovat

**SOC médium**

trypton 20 g

yeast extrakt 5g

1 M NaCl 10 ml

1M KCl 0,625 ml

doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 1000 ml

pH 7,0 (upraveno 1M NaOH nebo 1 M HCl), sterilizováno a po vychlazení na pokojovou teplotu přidáno:

2M Mg<sup>2+</sup> zásobní roztok 2 ml

2M glukosa 2 ml

2M Mg<sup>2+</sup> zásobní roztok

MgCl<sub>2</sub>x4 H<sub>2</sub>O 2,03 g

MgSO<sub>4</sub>x7 H<sub>2</sub>O 2,47 g

doplnit dest. H<sub>2</sub>O do 10 ml

### **2.1.2. Bakteriální kmeny *E.coli***

*E. coli* XL1-blue (Bullock *et al.*, 1987)

*E. coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1985)

### **2.1.3. Bakteriální kmeny r. *Streptomyces***

*Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* NRRL 3143

#### **Použité chemikálie**

Agar (Oxoid, Basingstoke, VB)

Malt extrakt (Oxoid, Basingstoke)

Pepton (Oxoid, Basingstoke, VB)

Trypton (Oxoid, Basingstoke, VB)

Yeast extrakt (Oxoid, Basingstoke, VB)

#### **Antibiotika:**

Ampicilin (Fluka)

Kanamycin – kanamycinsulfát (Sigma)

#### **Enzymy:**

Lysozym (Sigma)

proteináza K (10mg/ml) (Merck)

RNáza (Sigma)

T4-DNA ligáza (Fermentas)

CIP - Telecí intestinální alkalická fosfatáza (Fermentas)

Restrikční endonukleázy: BamH I, Pst I, Xho I, EcoR I (Fermentas)

#### **Vektory:**

pBluescript KS+, velikost: 2961 bp, citace: Altling-Mees and Short, 1989, číslo v GenBanku: X52329

SuperCos 1, velikost: 7900 bp (Stratagene), (obr. 8)

Primery:

SuperCosF1: 5'–CAAATAGGGGTTCGCGCAC-3'

SuperCosR1: 5'–ACAGGTGCTGAAAGCGAGC-3'

antWfor: 5'–TSGACGTSGGCTGCGG-3'

antWrev2: 5'–GAAGAAGTCGTCGTCGTT-3'

anbWfor: 5'–CCGAATTCCGTGGACGCCTG-3'

anbWrev2: 5'–CGGGATCCCGCCGATCAGCA-3'

DNA velikostní standardy pro elektroforézu

Pro lineární fragmenty – GeneRuler™ DNA Ladder Mix SMO332 (c= 0,5mg DNA/ml)  
(Fermentas)

Pro kruhové plazmidové molekuly – Standard pTZ 18R, 2871 bp, 10 µL=400 ng

Pufry a roztoky:

Pufr TAE                      40 mM Tris-acetát

1 mM EDTA

pH 8,0

Pufr TE                      10mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 8,0

20xSSC (sterilní)        3MNaCl

0,3 M citrát sodný

pH 7,0

Neutralizační roztok    1,0 M Tris-HCl,

1,5M NaCl

pH 7,4

Detekční roztok        1:10 komerční zásobní roztok v H<sub>2</sub>O, rozpustí se při zahřátí

Denaturační roztok    0,5M NaOH

1.5M NaCl

### Přístroje

Kromě běžného vybavení molekulárně biologických laboratoří:

Centrifugy:

- Biofuge pico
- Rotina 35 R - Hettich

Biometra PCR-termocycler: T-Gradient

Biometra BioDoc Analyze

Genetický analyzátor: ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems

Techne Hybridiser HB – 10

Vakuová sušička – Concentrator 5301, Eppendorf

### Počítačové programy

Lasergene (DNASTAR) – program pro manipulaci a analýzu sekvenčních dat.

Chromas verze 1.43 (Groffith University, Brisbane Australia) – program pro kontrolu správnosti sekvence získané pomocí sekvenčního přístroje

BLAST (Basic local Alignment Search Tools) – provyhledání a porovnání sekvence v databázích (Altschul *et al.*, 1997)

### Komerční soupravy:

The Novel Plasmid Purification System - Izolace plazmidové DNA z *E. coli* (JET Star)

MinElute PCR Purification Kit Protocol – (Qiagen)

PCR DIG labeling mix – Značení sond na chromozomální DNA (Roche)

DIG Luminiscent Detection Kit for Nucleic Acids – Koloniová hybridizace a detekce (Roche)

WIZARD DNA Clean-up System - Čištění PCR produktů (Promega)

SuperCos 1 Cosmid Vector Kit - Kit pro přípravu genomové knihovny (Stratagene)

Gigapack III Gold - Kit pro přípravu genomové knihovny (Stratagene)

DyeEx 2.0 Spin Kit (250), (Qiagen)

## **2.2. Metody**

### **2.2.1. Kultivace a uchovávání kmenů**

#### **2.2.1.1. Kultivace *E. coli***

Buňky *E. coli* byly kultivovány v LB mediu nebo na LB agaru při 37 °C. Antibiotika ampicilin (100µg/ml media), nebo kanamycin (20µg/ml media) byla do půdy přidávána pro selekci transformantů.

#### **2.2.1.2. Kultivace *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans***

*Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* byl kultivován buď na BG agaru nebo pro účely izolace DNA v tekutém BG médiu ve 28 °C nebo 37 °C nejčastěji po dobu 3-4 dnů.

#### **2.2.1.3. Konzervace kmenů *E. coli***

Ve sterilní 50 ml zkumavce bylo zaočkováno 10 ml LB média 1-2 koloniemi *E. coli* z misky. V době pozdní log fáze bylo přidáno 4,5 ml sterilního glycerol-tekutého média (5 ml glycerolu + 5 ml LB média).

Po rozdělení po 1 ml do sterilních Eppendorfových mikrozkuvek je možné skladovat konzervu v -20 °C po 1-2 roky nebo v -80 °C více než 2 roky.

#### **2.2.1.4. Příprava kompetentních buněk**

Kompetence je stav, při kterém jsou bakterie schopné přijmout cizorodou DNA. Pro navození kompetence jsme použili metodu podle Hanahana 1983.

Bylo připraveno 25 ml sterilního TYP média (nebo LB media), 10 ml sterilního 10 % glycerolu, 250 ml SOC. média a všechny doplňkové komponenty.

Po naočkování 25 ml TYP média buňkami *E. coli* (XL1-Blue) a inkubaci přes noc (200rpm, 37 °C) bylo nejprve odebráno 0,3 ml kompletního SOC média jako blank pro měření optické denzity a následně naočkováno 250 ml kompletního SOC média 10 ml hustě narostlého inokula. Následovala inkubace při 37 °C a v půlhodinových intervalech měření optické denzity kultury ( do OD<sub>600nm</sub>).

Když byla naměřená hodnota v intervalu 0,6 – 0,8 byla baňka s kulturou byla neprodleně vložena do ledové lázně. Všechny následující kroky probíhaly ve 4 °C.

Buňky byly sedimentovány ve sterilních centrifugačních zkumavkách (4°C, 5000 rpm, 10 min) a promyty minimálně dvakrát přechlazeným 10% glycerolem (20 ml, 5 min, 5000 rpm, 4 °C). Pelet byl resuspendován v 2 ml 10 % glycerolu.

Připravené kompetentní buňky byly rozděleny do alikvotů po 200 µl, okamžitě zamrazeny v kapalném dusíku a skladovány v – 70 °C.

### **2.2.2. Izolace chromozomální DNA ze *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans***

(protokol dle Hopwood 2002, modifikovaný dle Dr. Felsberga)

5 x 500 ml Erlenmayerových baněk obsahujících 100 ml YEME média bylo zaočkováno z misky. Inkubace probíhala ve 28 °C 2 dny při 200 rpm. Po té byly buňky odděleny od média centrifugací a promyty dvakrát 200 ml roztoku TE. Byla určena hmotnost mycélia.

Další postup odpovídá 10 g biomasy: buňky byly resuspendovány v 50 ml TE (nejlépe v 250 ml láhvi se šroubovacím uzávěrem), bylo přidáno 100 mg lysozymu (rozpuštěného v malém objemu sterilní destilované vody a dobře promícháno). Inkubace probíhala při 30°C do objevení se první lyze (cca 20 minut).

Bylo přidáno 12 ml 0,5M EDTA, pH 0,8 (konečná koncentrace byla 0,1 M EDTA), dále 1,5 ml proteinázy K (konečná koncentrace 10mg/ml) a po inkubaci 5 min při 30 °C bylo přidáno 7 ml 10% SDS (konečná koncentrace byla 1%). Suspenze byla dobře promíchána a inkubována při 30°C do úplného vyjasnění (asi 5 – 10 min).

Po té bylo přidáno 35 ml neutrálního fenolu a suspenze byla opatrně v ruce promíchána po dobu 10 min. Po přidání 35 ml směsi chloroform/izoamylalkohol a dalším míchání po dobu 5 min následovala centrifugace 10 min při 4000 rpm a odebrání horní vodné fáze pipetou s uštíženou špičkou. Dále byla zopakována extrakce fenolem.

Po určení objemu roztoku DNA a odebrání asi 20 µl na kontrolní elektroforézu byla přidána RNasa do koncentrace 40 µg/ml a směs inkubována 1 hod při 37°C. Po inkubaci byl odebrán další vzorek pro kontrolu účinnosti RNasy



Ve 250 ml kádince bylo převrstveno 20 ml roztoku DNA 2 objemy izopropanolu. Vysrážená DNA byla navíjena na skleněnou tyčinku (pro každých 20 ml roztoku jsme použili novou), tyčinky promyty ethanolem (2 min) a ponechány na vzduchu oschnout.

Každá tyčinka byla vložena do 20 ml TE a DNA rozpouštěna přes noc.

Dalších 20 ml TE bylo přidáno, dobře promícháno a vysráženo po 10 ml alikvotech. DNA z jedné nebo dvou tyčinek byla rozpouštěna (dle množství) ve 4 ml TE ( minimálně přes noc ve 4°C)

Výsledný velmi viskózní roztok DNA měl obvykle koncentraci 0,7 – 2 mg/ml.

### **2.2.3. Izolace plazmidové DNA z *E.coli***

Byl použit komerční kit: Protokol plasmid Miniprep od firmy JET star.

### **2.2.4. Analýza a úpravy DNA**

#### **2.2.4.1.Stanovení koncentrace a kvality DNA**

Kvalitu izolované DNA lze zkontrolovat elektroforeticky na agarózovém gelu, jedná-li se o kruhové molekuly. Dále lze kvalitu určit spektrofotometricky.

Pro dvouvláknové DNA platí, že při vlnové délce 260 nm se absorbance rovná 1/, pokud je koncentrace DNA 50 µg/ml.

Koncentraci DNA vypočítáme ze vzorce:

$$K=A_{260} \times 50 \times V \times \text{ředění}$$

K ..... koncentrace DNA

A<sub>260</sub> ..... hodnota absorbance při 260 nm na 1 cm

V ..... objem naředěného vzorku

Ředění ..... měřený vzorek DNA jsme naředili tak, aby se hodnota absorbance při 260 nm pohybovala v rozsahu 0,2 – 0,3.

U každého vzorku měříme absorbanci při třech vlnových délkách:

A<sub>235</sub> nm polysacharidy, A<sub>260</sub> nm DNA, A<sub>280</sub> nm proteiny.

Z těchto hodnot stanovíme koeficienty poměrem čistoty

$\frac{A_{260}}{A_{235}}$  a  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  . Výsledné hodnoty by měly být v rozmezí 1,8 – 2,0.

#### **2.2.4.2.Štěpení DNA restrikčními endonukleázami**

Ke 2–10 µl vodného roztoku plasmidové DNA v Eppendorfově mikrozkuhavce bylo přidáno 2 µl 10 x koncentrovaného restrikčního pufru a 1 µl restrikční endonukleázy. Druh pufru byl zvolen podle doporučení výrobce příslušného enzymu. Štípání bylo prováděno po dobu 1 – 2 hodin při teplotě optimální pro daný enzym. Reakce byla zastavena buď přidáním roztoku bromfenolové modři nebo zahřátím reakční směsi na 65 °C po dobu 5 minut. Tím byl vzorek rozštěpené plasmidové DNA připraven pro elektroforetickou analýzu a pro další pokusy.

#### **2.2.4.3.Defosforylace vektoru pomocí hovězí alkalické fosfatázy (CIP)**

Vektor byl štěpen v Eppendorfově mikrozkuhavce příslušnou restrikční endonukleázou. Poté byla rozštěpená DNA vysrážena ethanolem (kap.2.7.8) a rozpuštěna v 45 µl H<sub>2</sub>O. K rozpuštěné DNA bylo přidáno 5 µl pufru CIP (0,2 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, pH = 8,0) a CIP (C=1 U/µl). Množství použité CIP bylo zjištěno na základě následujících údajů:

Pro 1 pmol konců DNA (≈ 2,5 µg fragmentu DNA o velikosti 3 kb) je třeba toto minimální množství enzymu:

pro 5'-přečnívající konce: 0,1 U

pro tupé konce: 0,2

pro 3'-přečnívající konce: 0,5 U

Množství enzymu může být zvýšeno, ale přebytek enzymu někdy způsobuje horší výsledky.

Po přidání CIP byla směs inkubována 1 hod při 37 °C a enzym byl poté inaktivován po dobu 15 minut při teplotě 65 °C. poté byla DNA přesrážena ethanolem, rozpuštěna ve vodě a použita pro ligaci.

#### **2.2.4.4.Ligace fragmentů plasmidové DNA**

Restrikční fragmenty plasmidové DNA byly ligovány T4-DNA ligasou. Množství fragmentů plasmidové DNA pro klonování do příslušného vektoru bylo vypočteno podle vzorce:

$$c_i = \frac{c_v \cdot s_i}{s_v} \cdot MR$$

$c_v$  – množství vektoru (ng)

$c_i$  – množství klonovaného fragmentu

$s_v$  – velikost vektoru (kb)

$s_i$  – velikost vkládaného fragmentu (kb)

MR – zvolený molární poměr fragment /vektor (obvykle 3/1)

Ke směsi fragmentu plazmidové DNA a vektoru byla přidána 1/10 celkového objemu 10 x koncentrovaného legačního pufru a 1 µl T4 – DNA ligasy. Po krátké centrifugaci (13 000 x g/2-3 s) byla legační směs inkubována 4 hodiny při 15 °C a poté 12 – 16 hodin 4 °C. Po ověření účinnosti ligace elektroforézou byla ligační směs použita pro transformaci kompetentní kultury.

#### **2.2.4.5. Elektroforetická analýza DNA**

Elektroforetická analýza DNA byla prováděna v horizontálním agarovém gelu (0,8 – 1,2 %) v pufru TAE. K vzorkům DNA (obvykle 5-15 µl) byly přidány 3 µl indikační směsi (25 % Ficoll, 0,2 % bromfenolová modř). Takto připravené vzorky byly vneseny do jamek v agarosovém gelu umístěném v elektroforetické nádobě naplněné pufrem TAE. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 65 – 85 V. Po skončení elektroforézy byl gel barven 20 min ve vodném roztoku ethidium bromidu a pásy DNA byly dokumentovány a vizualizovány v ultrafialovém světle (254 nm) na přístroji Biometra BioDocAnalyse.

#### **2.2.4.6. Odhad velikosti a koncentrace fragmentů plazmidové DNA**

Velikost plazmidové DNA a jejich koncentrace ve vodném roztoku byla odhadována v agarosovém gelu při osvětlení UV porovnáním pohyblivosti a intenzity zbarvení odpovídajícího pásu DNA s pásy fragmentů DNA bakteriofága λ o známé velikosti a koncentraci.

#### **2.2.4.7. Extrakce DNA fenolem**

Fenol/chloroformová extrakce slouží k přečištění roztoku DNA od nežádoucích látek (bílkovin, solí apod.) a k udržení kvality izolované DNA.

Výchozí objem plazmidové DNA byl důkladně promísen se stejným objemem směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:21). Po následné centrifugaci (12 000 rpm po 10 min) byla horní vodná fáze odebrána a DNA v ní obsažena byla vysrážena 2,5 objemu  $\text{LiClO}_4$  a sediment rozpuštěn ve vodě.

#### **2.2.4.8.Purifikace ds DNA z PCR**

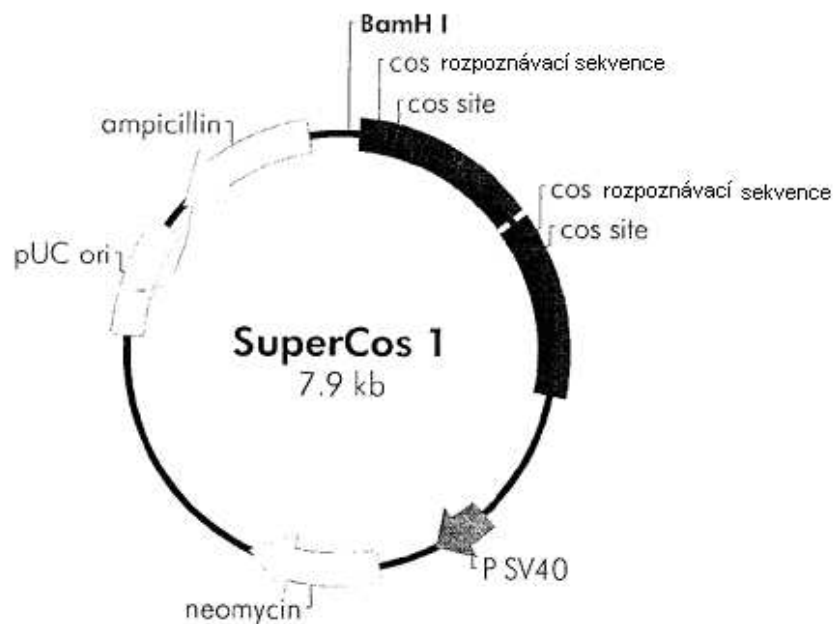
Komerční kit: MinElute PCR Purification Kit Protocol (Qiagen)

#### **2.2.4.9.Vytvoření genomové knihovny**

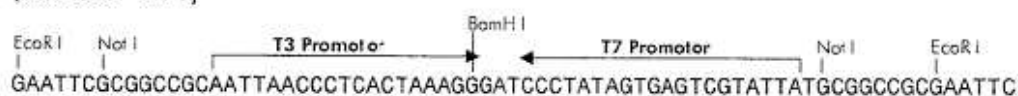
Genomová knihovna je sada fragmentů DNA pokrývajících celý genom daného organismu. Vzniká štěpením chromozomální DNA pomocí restrikčních endonukleáz na fragmenty o různých velikostech. Tyto fragmenty jsou pak nejčastěji vkládány do kosmidu a tím je umožněno její namnožení. Kosmidy jsou plazmidy se zabudovanými částmi sekvence bakteriofága  $\lambda$  (tzv. cos-sekvence), která umožňuje efektivní prostorovou organizaci velkých molekul DNA a následnou transformaci buněk *E.coli*.

Pro tvorbu genomové knihovny bylo přesně postupováno podle protokolu komerční soupravy SuperCos 1 Cosmid Vector Kit (vektor SuperCos 1 – obr.8) a Gigapack III Gold, obojí od firmy Stratagene.

## Vektor SuperCos 1



### SuperCos 1 klonovací oblast (sekvence 1-71)



Obr. 8 Mapa vektoru SuperCos 1

### 2.2.4.10. Hybridizace

Hybridizace je metoda při níž se využívá komplementární vazby malého úseku ssDNA, tzv. sondy, k odpovídajícímu místu v molekule DNA, což slouží k vyhledání a označení tohoto místa.

Koloniová hybridizace byla prováděna přesně podle protokolu Roche DIG Application Manual, detekce pak podle téhož protokolu a navíc podle protokolu firmy Amersham, AlkPhos Direct Labelling Kit. Dále byla pro tyto protokoly použita pozitivně nabitá nylonová membrána (Roche), protilátka anti- DIG- dUTP (Roche) a chemiluminiscenční substrát CDP-Star.

## **2.2.5. Genetické přenosy**

### **2.2.5.1. Transformace *E. coli* plazmidovou DNA (podle Hanahana, 1985)**

Buňky, které mají schopnost přijmout cizorodou DNA (např. rekombinovanou DNA plasmidu aj.) se nazývají „kompetentní“. Proces, který vede k přijetí této cizorodé DNA se nazývá transformace. Zde byla pro transformaci použita metoda tepelného šoku, kdy jsou buňky a DNA vystaveny na krátkou dobu teplotě 45 °C. To vede k přechodně zvýšené propustnosti bakteriální stěny a tím byl umožněn vnik plasmidů do vnitřního prostředí buňky.

Pro transformaci byla použita subklonovaná DNA z pozitivních klonů genomové knihovny *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* do plasmidu KS pBluescript.

Aliquot kompetentních buněk byl uložen do ledu. K 10 µl ligační směsi bylo přidáno 100 µl kompetentních buněk. Směs byla inkubována při 4 °C 1,5 hod. Poté byla vložena na 90 sec do 45 °C a následně opět navracena do 4 °C.

Po přidání 1 ml LB média a inkubaci při 200 rpm 1 hod ve 37 °C byly buňky naočkovány ve dvou koncentracích (ředěné 1:10 a 1:100) na kultivační misky s ampicilinem, IPTG a X-gal pro selekci rekombinantních klonů.

### **2.2.5.2. Identifikace klonů s rekombinantními plazmidy alfa-komplementací**

Tato metoda je využívána jako jedna s možností selekce transformantů. Některé vektory (např. p Bluescript) obsahují gen *lacZ* kódující peptid *lacZα*. Jeho přítomnost v buňce způsobuje modré zabarvení kolonií v půdě obsahující IPTG a X-Gal. Vložením cizího úseku DNA do tohoto genu dojde k jeho přerušení, což se projeví změnou barvy kolonie z modré na bílou.

Po transformaci kmene *E. coli* DH5α byly buňky resuspendovány ve fyziologickém roztoku. Před jejich výsevem bylo na misky obsahující půdu LA s příslušným antibiotikem aplikováno roztěrem po 40 µl zásobního roztoku X-Gal (20 mg/ml dimethylsulfoxidu, uchovávan při -20 °C) a 4 µl zásobního roztoku IPTG (200 mg/ml, uchovávan při -20 °C). Oba roztoky je možno přidat do agaru již při nalévání misek. Po 16 hodinové inkubaci při 37 °C byly kolonie s rekombinantními plazmidy bílé, kolonie s vektorem bez klonovaného fragmentu modré.

### **2.2.6. PCR – polymerázová řetězová reakce**

PCR je základní metodou molekulární biologie. Je to in vitro metoda pro enzymatickou syntézu sekvencí DNA definovaných dvěma primery.

Pro amplifikaci kosmidového insertu byly použity primery SuCosF1 a SuCosR1.

### **2.2.7. Sekvenování**

Sekvenováním DNA získáme úplnou informaci o genetickém záznamu formou pořadí bazí. Metoda sekvenování pomocí koncových inhibitorů syntézy DNA vychází z poznatků, že běžně používané DNA závislé DNA polymerázy mohou jako prekursorů syntézy DNA využívat a zařadit kromě deoxyribonukleosid trofosfátů (dNTP) i dideoxyribonukleosidtrifosfáty (ddNTP). Tyto analogy dNTP však nemají 3'OH skupinu nutnou pro navázání dalšího nukleotidu. Zařazením ddNTP je tudíž ukončeno narůstání řetězce ve směru 5' – 3'. Délka řetězců stanovena elektroforeticky vypovídá o polohách jednotlivých nukleotidů (metoda „dideoxy chain termination method“, SANGER *et al.*, 1977).

Při sekvenování jsme používali ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verze 3.1.

Do mikrozkušavek byla napipetován vzorek DNA (PCR fragment, 400 ng plasmidové DNA, 1,5 – 2 µg kosmidové DNA), sekvenační primer (1 µl o konc. 10 pmol/µl ≈ 10 µM), Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (8 µl) a H<sub>2</sub>O do celkového objemu 20 µl.

Následovala elongační reakce v termocykléru: pro plasmidovou DNA – 35 cyklů: 96 °C (10 s), 50 °C (5 s), 60 °C (4 min), 4 °C (konec) a pro kosmidovou DNA - 60 cyklů: 95 °C (5 min), 95 °C (30 s), 56 °C (10), 60 °C (4 min), 4 °C (konec).

Dále byla směs purifikována pomocí gelové filtrace Dye Ex 2.0 Spin Kit (Qiagen). Přechištěné vzorky byly vysušeny ve vakuové sušičce (Eppendorf).

Produkty byly analyzovány pomocí sekvenčního přístroje (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer). Závěrečné sekvence PCR fragmentu byly editovány pomocí počítačových programů Laser Gene a Chromas.

### 3. Výsledky

#### 3.1. Test kultivace

Byl sledován růst *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* na různých půdách a za různých teplot.

Pro kultivaci bylo použito sedm médií, používaných pro kultivaci organismů rodu *Streptomyces*. Kultivace probíhala po dobu 2-4 dnů při teplotách 28 °C a 37 °C.

Po 29 hodinách byl zaznamenán nejlepší nárůst se začátkem tvorby spor na médiu ISP2 při 37 °C (tab.2).

Po 55 hodinách ve 37 °C se sporulace objevila na médiích YES, s menším nárůstem pak i na médiích ISP4 a YEME, obsahujícím 10 % sacharózy(tab.3).

Na médiích SS, YEME a YEME s 34% sacharózy nebyl patrný nárůst z počátku po 29 hodinách kultivace při 37 °C (tab.2), později se objevila kontaminace (tab.3).

Po 96 hodinách se plně rozvinula fáze diferenciaci se sporulací na médiích YES, ISP2, ISP4 a YEME s 10 % sacharózou při teplotě 37 °C i 28 °C (tab.4).

Růst ve 28 °C byl u všech médií výrazně pomalejší (tab.2,3,4)

Nakonec se nejlepší růst ukázal na médiu ISP2 (neboli BG) při 37°C.



Medium (100mL)	37°C	28°C
YES	+++	--+
SS	---	---
ISP2	+++ (sporulace)	-++
ISP4	+++ (zač. sporulace)	--+
YEME	---	---
YEME 10%	+++	--+
YEME 34%	---	---

Tab 2: Růst *Streptomyces refuaneus* var. *thermotolerans* po 29 hod.

Medium (100mL)	37°C	28°C
YES	+++ ( zač.sporulace)	--+
SS	---	kontaminace
ISP2	+++ ( zač.sporulace)	-++ ( zač.sporulace)
ISP4	-++ ( zač.sporulace)	--+ ( zač.sporulace)
YEME	---	kontaminace
YEME 10%	-++ ( zač.sporulace)	--+ ( zač.sporulace)
YEME 34%	---	kontaminace

Tab 3: Růst *Streptomyces refuaneus* var. *thermotolerans* po 55 hod.

Medium (100mL)	37°C	28°C
YES	+++ (sporulace--+)	--+ (sporulace - - +)
SS	---	kontaminace
ISP2	+++ (sporulace+++)	-++ (sporulace+++)
ISP4	-++ (sporulace-++)	-+ + (sporulace- - +)
YEME	---	kontaminace
YEME 10%	-++ (sporulace--+)	-++ (sporulace)
YEME 34%	---	kontaminace

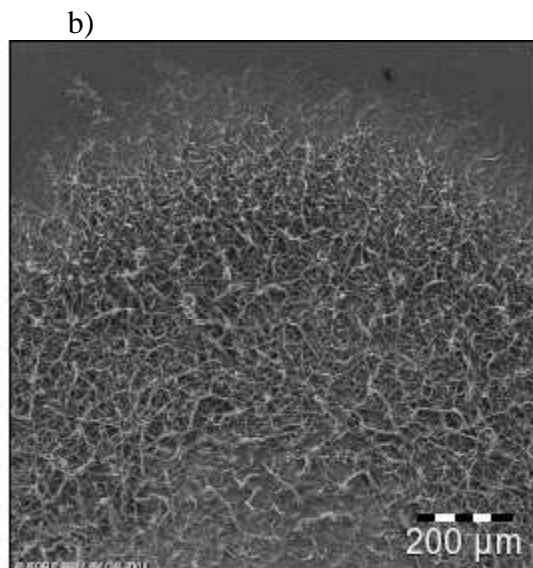
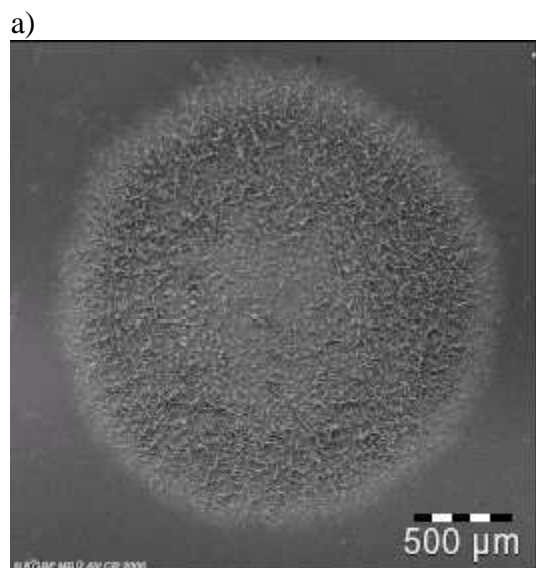
Tab 4: Růst *Streptomyces refuaneus* var. *thermotolerans* po 97 hod

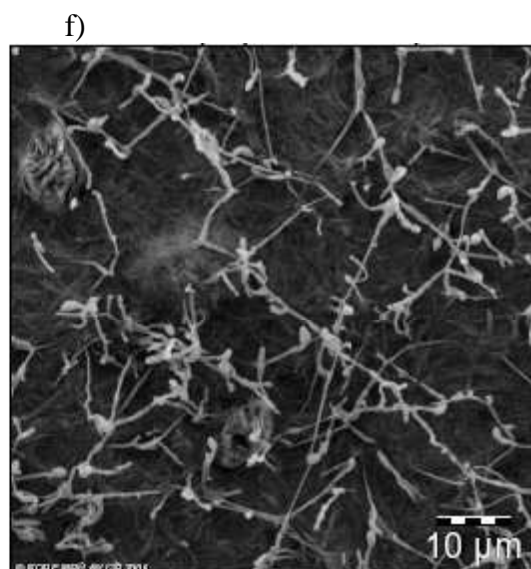
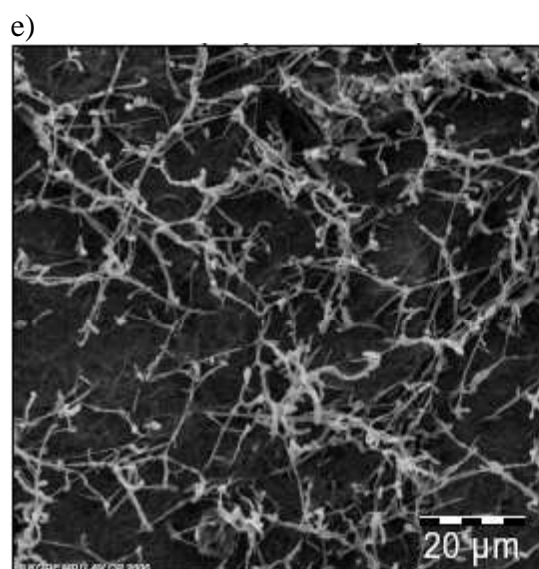
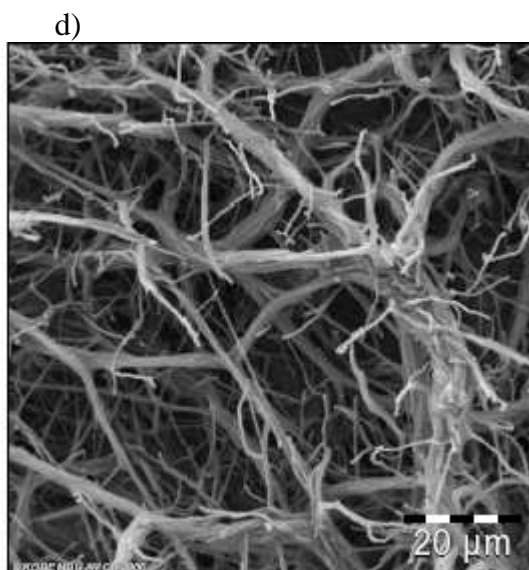
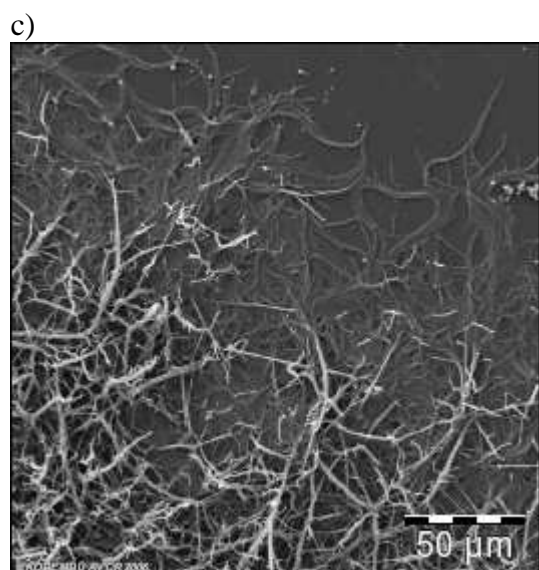
### **3.2. Mikroskopické zobrazení buněk a kolonií *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans***

Elektron-mikroskopické snímky byly provedeny v laboratoři elektronové mikroskopie Mikrobiologického ústavu AV ČR RNDr. O Benady, CSc..

#### **3.2.1. Elektronmikroskopický obraz různých růstových fází *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans*.(obr.9)**

Na elektron-mikroskopických snímcích a) a c) je vidět počáteční fáze růstu *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* na půdě BG, následuje tvorba vzdušného mycelia na snímcích b) a d). Na posledních dvou fotografiích č. e) a f) je již patrná tvorba spór.

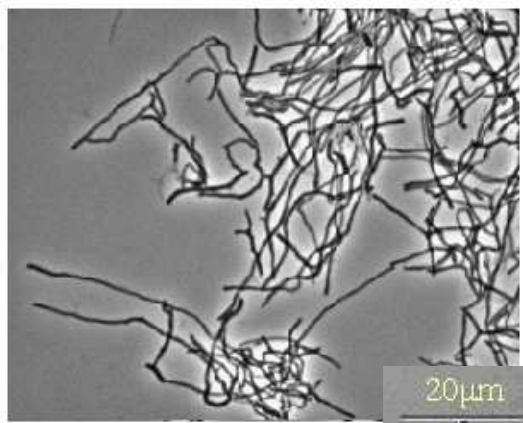




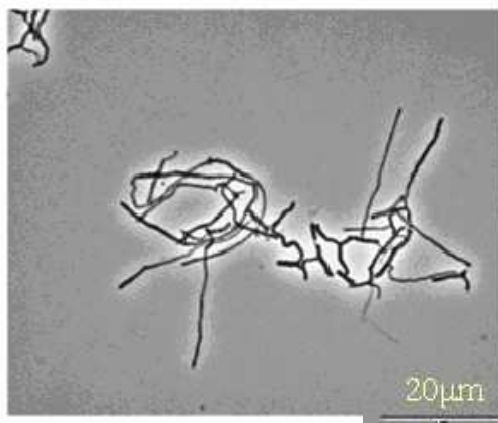
Obr. 9. jednotlivé fáze růstu *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* na pevném BG médiu: a) pohled na samostatnou kolonii *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans*, b) počátek tvorba vzdušného mycélia, c) pomezí substrátového a vzdušného mycélia, d) vzdušné mycélium e) a f) mycélium s počínající tvorbou spór. (Se souhlasem RNDr. O Benady, CSc, Laborař elektronové mikroskopie MBÚ AV ČR.)

**3.2.2. Buňky submerzní kultury *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* v optickém mikroskopu.(obr.10)**

a)



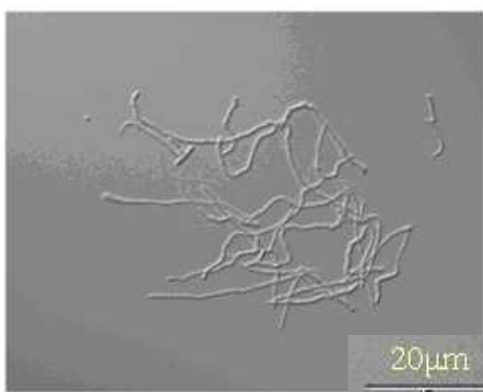
b)



c)



d)



Obr. 10. Submerzní kultura *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* na konci logaritmické růstové fáze v BG médiu: a) a b) fázový kontrast, c) a d) zobrazení pomocí kondenzoru dle Nomarského. (Olympus BX60 v laboratoři Ing. J. Haška, CSc)

### **3.3. Izolace chromozomální DNA z *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans*.**

Dobrý nárůst umožnil izolaci chromozomální DNA. Izolace proběhla bez zvláštních nároků ohledně kroku buněčné lyze, což dělá často potíže u příbuzných organismů. Další kroky analýzy chromozomální DNA bylo možné snadno provést díky tomu, že izolace DNA vedla k dostatečnému množství izolátu o velké čistotě.

Na obr. 11 je elektroforetická analýza izolované chromozomální DNA *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans*.

Obr.11 →

1.dráha: lineární standard, 2.dráha chromoz. DNA Str. Ref. naneseno 1 $\mu$ L 3. dráha chromoz. DNA Str. Ref naneseno 5  $\mu$ L



Byla provedena identifikace sbírkového kmene *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* NRRL 3143 pomocí analýzy 16S DNA. Srovnáním sekvence 16S DNA tohoto kmene se sekvencí v databázi bylo potvrzeno, že se skutečně jedná o *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans*. Výsledky zde nejsou uvedeny.

### **3.4. Příprava genomové knihovny**

Podle protokolu soupravy SuperCos 1 Vector Kit (Stratagene) byla připravena genomová knihovna, která obsahovala celkem 12 000 klonů. Pro vyhledání anthramycinového shluku bylo testováno 1000 kolonií na přítomnost analogu genu *lmbW*. Gen *lmbW* pochází ze shluku genů pro biosyntézu linkomycinu, který je obsažen v genomu *Streptomyces lincolnensis*. Tento gen patří do společné části biosyntetické dráhy linkomycinu a anthramycinu, proto byl použit jako sonda.

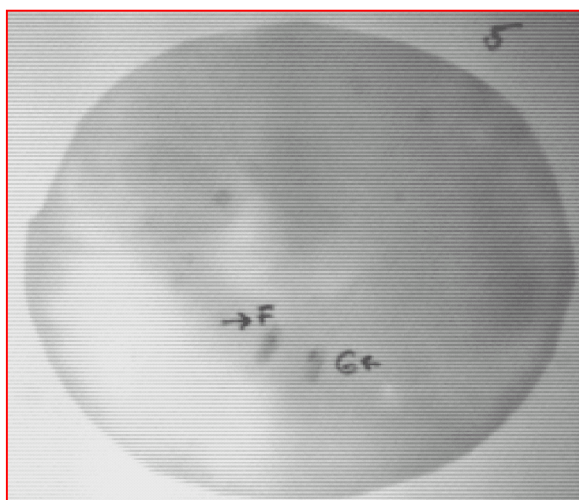
Pomocí specifických primerů pro *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* byl osekvenován 357 bp dlouhý fragment analogu genu *lmbW*. (obr.12)

Tímto jsme získali „vstup“ do shluku pro biosyntézu anthramycinu.

	>gi 499194 emb X79146.1 SL LINC D S.lincolnensis (78-11) Lincomycin production Length=36270			
1.1	Score = 184 bits (93), Expect = 1e-43 Identities = 248/297 (83%), Gaps = 2/297 (0%) Strand=Plus/Minus			
1.2	Query 1	CGCCGATCAGCAGGATCTTCTGCTGCGGGAACCTTCGCCGAGATCTCGTCCAGCAGGTCCA	60	
	Sbjct 27589	CGCCGACCAGCAGGATCTTCTGGTGGCGGAACCGCGCCGCTACTCGTCGAGCAGCTCGA	27530	
1.3	Query 61	CGACGGCCTGCTCGCCCTTGGCGAAGTGCTCGTGACGCGGCTCATCATGCACAGCCCGT	120	
	Sbjct 27529	CCACGGCCTGCTCGCCATGACGGAAGTGCTCGTGACGGGCGCTCATCACGCACAGGCCGT	27470	
1.4	Query 121	CGGCCCTCGGCGCAGACCTCGGGCCACGTCTG-GGGCGCGAAGGCGTCCGCGACGACGAAC	179	
	Sbjct 27469	CCGCCCTCGTAGCAGACCTCGGGCCA-GTCGGCCGGCGCGAAGGCGTCGCCACCACGAAC	27411	
1.5	Query 180	TCCACCCGGTCGGACACGCCGTGGCGGCGCGGAGGTCGTTGGCGACCGCGATGGCGTCC	239	
	Sbjct 27410	TCCACCCGGTCGCCACGCCCTGGCGTTCTGCCAGGTCCTGGGCCACCTCGACGGCGGCG	27351	
1.6	Query 240	GCGTCGATGTCCAGACCGATGCCGGTGAGGGACGGGTCGCGCAGACAGGCGTCCACG	296	
	Sbjct 27350	GGGTCGATGTGAGACCGATGCCGGTGAGGAGGGTCGCGCAGGCAGGCGTCCACG	27294	

Obr. 12 BLAST analýza sekvence části analogu genu *lmbW*, tzn. genu *anbW* s původní sekvencí linkomycinu ukazuje 83 % podobnost s genem *lmbW* ze *Streptomyces lincolnensis*.

### 3.5. Hybridizace



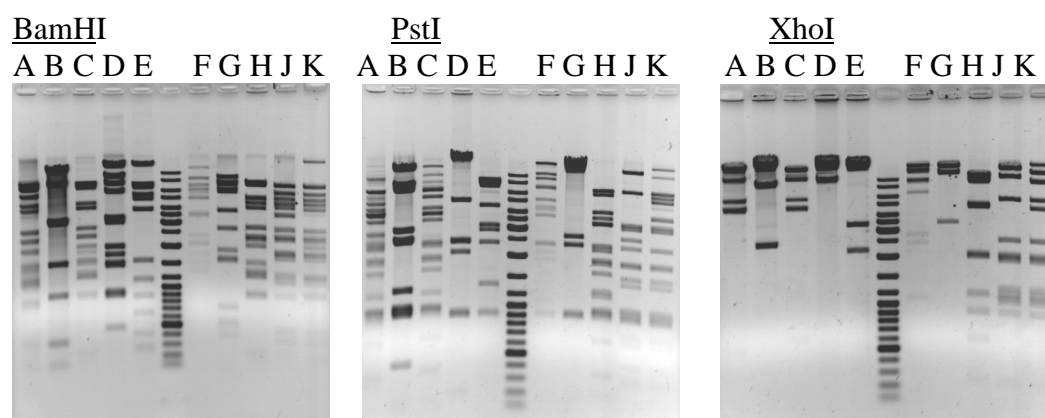
Hybridizací s *lmbW* sondou jsme detekovali celkem 10 pozitivních klonů, které jsme nazvali písmeny A, B, C, D, E, F, G, H, J, K (obr.13).

Obr. 13 Detekce pozitivních klonů F a G na negativu

Z nich jsme vybrané klony později osekvenovali pomocí primerů vektoru SuperCos 1: SuperCosF1 a SuperCosR1. Pomocí analýzy BLAST byla zjištěna 96% podobnost s různými druhy rodu *Streptomyces* (např. *Streptomyces avermitilis*). Na konci jsme zaznamenali 100% homologii s patentovanou sekvencí anthramycinového shluku.

### 3.6. Restrikční analýza a hybridizace se sondou *anb W*

Shodnost nebo rozdílnost jednotlivých klonů jsme ověřili restrikční analýzou pomocí 3 enzymů: *Bam*HI, *Pst*I a *Xho*I (obr. 14).



Obr. 14: Dráhy A až K odpovídají jednotlivým klonům po rozštěpení různými restrikčními endonukleázami na fragmenty o různé velikosti. Porovnáním délky fragmentů je zřejmé, že DNA každého klonu se liší od ostatních, tzn. že ve všech 10 klonech se neobjevuje duplicita.

Na základě restrikční analýzy bylo zjištěno, že jednotlivé klony „A“ až „K“ jsou různé, přičemž klon „K“ porovnáním v programu BLAST ukázal, že obsahuje kompletní shluk genů pro biosyntézu anthramycinu.

### **3.7. Sekvenování**

Byla provedena sekvenční analýza jednotlivých klonů. Sekvence byly porovnány pomocí BLAST analýzy se zpřístupněnou databází patentů. Analýza ukázala, že

- 1) alespoň část skluku genů kódující syntézu anthramycinu je obsažená v každém jednotlivém klonu A-H.
- 2) kon K obsahuje minimálně celý tento genový shluk
- 3) byl potvrzen výsledek restriční analýzy o různorodost inzertů jednotlivých klonů.

Výsledky jsou uloženy v elektronické podobě v databázi Střediska sekvenování DNA MBÚ AV ČR, V.V.I.



#### 4. Diskuse

Výsledky, které jsou uvedeny v příslušné kapitole, které jsem vypracovala v rámci projektu GAČR č. 204/04/0801 s názvem „Biosyntéza anthramycinových a linkosamidových antibiotik, zdroj pro nové hybridní látky s antibakteriálními, antimalarickými a protinádorovými účinky“

Prvním krokem výzkumného projektu bylo ověření růstu *Streptomyces refuineus* na různých půdách. Dle popisu patentu 4011140 ( United States Patent - „Process for producing antitumor compound“ ) je optimum růstu stanoveno mezi 35-55 °C na půdě ISP2 (neboli BG). Kultivovali jsme *Streptomyces refuineus* po dobu minimálně 3 až 4 dnů při teplotách 28 °C a 37 °C na různých půdách. Výsledkem byl potvrzen dobrý nárůst při 37 °C. Vzhled kolonií rovněž odpovídal popisu v patentu.

Izolace chromozomální DNA proběhla bez komplikací a bez nároků na speciální podmínky kultivace, což nebývá vždy pravidlem vzhledem k tomu, že krok enzymatické lyze pomocí lysozymu je zřídka u těchto mikroorganismů snadným. Kromě tohoto faktu se *Streptomyces. refuineus* var. *thermotolerans* choval při izolaci zcela typickým způsobem pro rod *Streptomyces*.

Po izolaci DNA následovala tvorba kosmidové knihovny, která sloužila k ligaci fragmentů genomu *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* do kosmidu SuperCos 1.

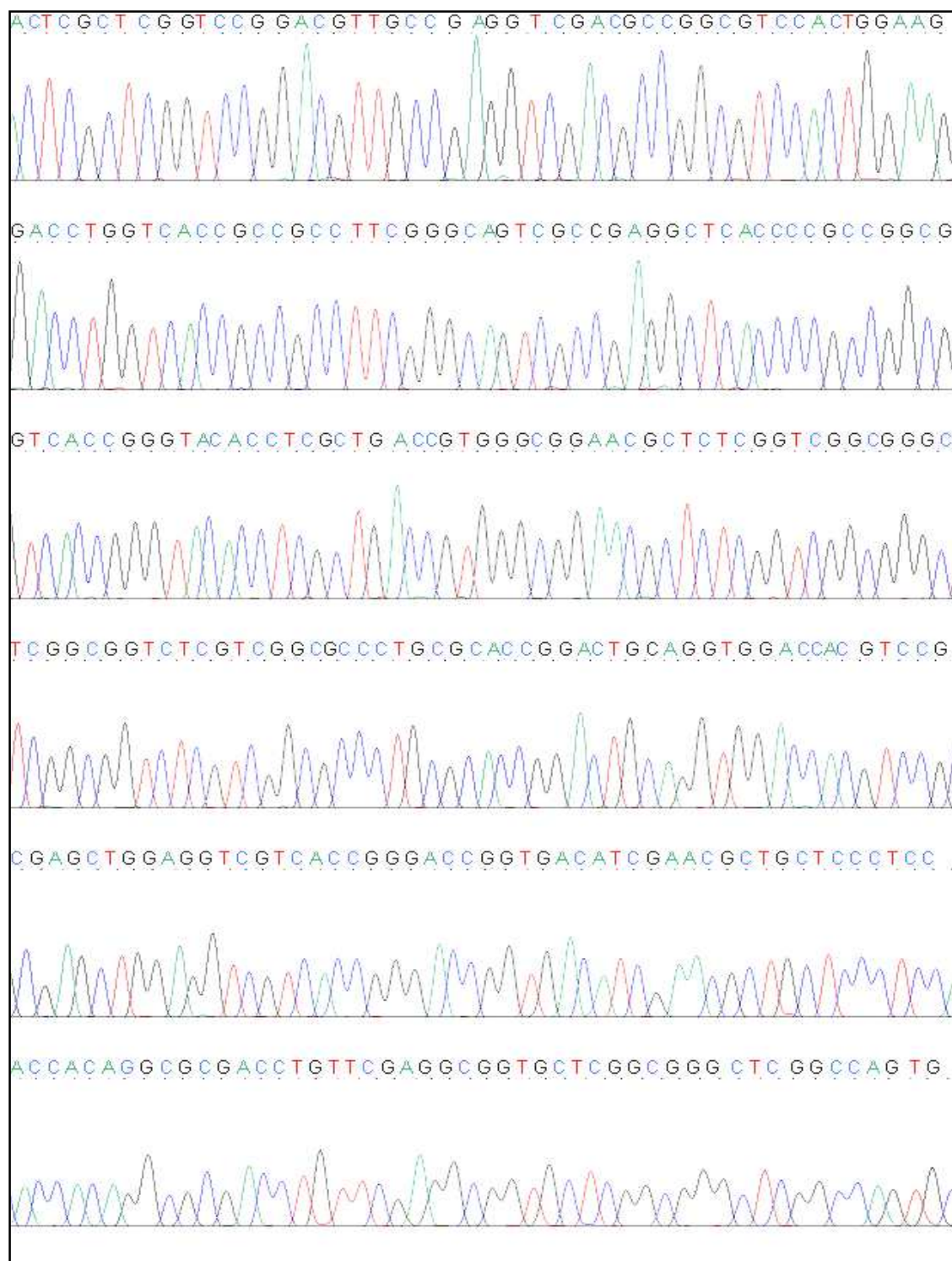
Dalším krokem byla detekce klonů obsahující anthramycinový cluster pomocí sondy *lmbW*, která pochází z organismu *Streptomyces lincolnensis* a je částí genu kódujícího metyltransferázu. Tato sonda byla vybrána na základě podobnosti části biosyntetické dráhy linkomycinu a anthramycinu. Analog genu *lmbW* by měl být přítomen ve shluku genů pro biosyntézu anthramycinu.

Na základě koloniové hybridizace se deset klonů ukázalo jako pozitivních na přítomnost analogu genu *lmbW* a s těmito byly prováděny další kroky. Hybridizaci DNA přenesené na nylonovou membránu byla prováděna několikrát s různými pro *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* modifikovanými protokoly převážně od firem Amersham a Roche. Jednotlivé metody se ukázaly jako srovnatelné jak do kvality výsledku, tak do časové náročnosti.

Pro srovnání jednotlivých kosmidů jsme provedli restriční analýzu, která prokázala, že jednotlivé kosmidy obsahují různé části anthramycinového biosyntetického shluku. Na základě BLAST analýzy konců jednotlivých kosmidů bylo zjištěno, že kosmid označený jako „K“ obsahuje celý shluk genů pro biosyntézu anthramycinu.

Naklonované fragmenty genomu *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* byly koncově osekvenovány pomocí univerzálních sekvenačních primerů. Porovnání se sekvencí v databázi ukázalo jak správnost sekvencí, tak různorodost sekvencí v kosmidech.

2 a)



### 3 b)

Sekvence z Patentu WO02101051

Délka=1464 bp

Identita = 436/436 (100%)

```

Query 1  ACTCGCTCGGTCCGGACGTTGCCGAGGTCGACGCCGGCGTCCACTGGAAGGACCTGGTCA 60
          |||
Sbjct 362 ACTCGCTCGGTCCGGACGTTGCCGAGGTCGACGCCGGCGTCCACTGGAAGGACCTGGTCA 421

Query 61  CCGCCGCCTTCGGGCAGTCGCCGAGGCTACCCCGCCGGCGGTACACGGGTACACCTCGC 120
          |||
Sbjct 422 CCGCCGCCTTCGGGCAGTCGCCGAGGCTACCCCGCCGGCGGTACACGGGTACACCTCGC 481

Query 121 TGACCGTGGGCGGAACGCTCTCGGTTCGGCGGGCTCGGCGGTCTCGTCGGCGCCCTGCGCA 180
          |||
Sbjct 482 TGACCGTGGGCGGAACGCTCTCGGTTCGGCGGGCTCGGCGGTCTCGTCGGCGCCCTGCGCA 541

Query 181 CCGGACTGCAGGTGGACCACGTCCGCGAGCTGGAGGTCGTCACCGGGACCGGTGACATCG 240
          |||
Sbjct 542 CCGGACTGCAGGTGGACCACGTCCGCGAGCTGGAGGTCGTCACCGGGACCGGTGACATCG 601

Query 241 AACGCTGCTCCCTCCACCACAGGCGCGACCTGTTTCGAGGCGGTGCTCGGCGGGCTCGGCC 300
          |||
Sbjct 602 AACGCTGCTCCCTCCACCACAGGCGCGACCTGTTTCGAGGCGGTGCTCGGCGGGCTCGGCC 661

Query 301 AGTGCGGCATCATCACCAAGGCGGTTCGTCGAACTCGTCCCCGCCAAGGAGCGCGCCCGCA 360
          |||
Sbjct 662 AGTGCGGCATCATCACCAAGGCGGTTCGTCGAACTCGTCCCCGCCAAGGAGCGCGCCCGCA 721

Query 361 CCTACGTGCTGGAGTACACCGACAACGCCGCGTTCTTCCGCGACCTGCGCACCGTCATCG 420
          |||
Sbjct 722 CCTACGTGCTGGAGTACACCGACAACGCCGCGTTCTTCCGCGACCTGCGCACCGTCATCG 781

Query 421 AGCGGCCCCGGCATCGA 436
          |||
Sbjct 782 AGCGGCCCCGGCATCGA 797

```

Obr.15 a) koncová sekvence anthramycinového shluku přítomná v klonu A, b) BLAST analýza: porovnání sekvence anthramycinového klonu A s publikovanou sekvencí anthramycinového shluku patentu WO02101051 ukazuje 100% identitu.

Hybridizací gelu po restrikční analýze se sondou *anbW* navrženou přímo z anthramycinového biosyntetického shluku pomocí speciálních primerů *anbWfor* a *anbWrev2* jsme potvrdili přítomnost analogu genu *lmbW* v anthramycinovém biosyntetickém shluku.

Nyní jsme pro snazší následnou manipulaci a pro sekvenování zmenšili velikost inzertů restrikcí pomocí PstI a BamHI. Vzniklé fragmenty jsme zaklonovali do plasmidů pBluescript KS.

Pomocí na sebe navazujících metod - od kultivace producenta, z něj izolace chromozomální DNA, vytvoření genové knihovny, hybridizace pomocí značené sondy pocházející z linkomycinového clusteru, po získání klonů obsahující anthramycin a jeho detekci, byl splněn vytčený cíl, tj. izolace shluku genů pro syntézu anthramycinu.

Následovat měla sekvenční analýza metodami subkolování, primer walking, shot gun, deleční metodou pomocí Exo III nukleázy, popř. metoda využívající transposony.

Mezitím, co jsme činili přípravy k sekvenaci, byla zpřístupněna databáze patentů, kde byla již uvedena kompletní sekvence genového shluku pro anthramycin společnosti Ecopia Biosciences Inc. z 22. března 2003. Z tohoto důvodu jsme nepokračovali v dalším úsilí v tomto směru.

Zjistili jsme, že dosud získané sekvence 100 % odpovídají sekvencím patentovaných firmou.

Pomocí primerů navržených z konců clusteru podle nyní již známé sekvence byl zjištěno, že jeden z klonů (klon K) obsahuje celý anthramycinový shluk.

## 5. Závěr

- 1) Kmen *Streptomyces. refuineus* jsme kultivovali na různých médiích za různých teplot za účelem zjištění kultivačního optima.
- 2) Izolovali jsme chromozomální DNA a vytvořili jsme kosmidovou knihovnu.
- 3) Identifikovali jsme pozitivní klony pro anthramycinový shluk genů pomocí sondy linkosamidového clusteru *lmbW*. A osekvenovali jsme vybrané klony z konců fragmentu.
- 4) Ověřili jsme přítomnost částí clusteru v jednotlivých kosmidech.
- 5) Fragменты původních inzertů jsme ligovali do plasmidů pro snazší manipulaci a sekvenování.
- 6) Zpřístupněním databáze obsahující patentované sekvence se sekvence anthramycinového clusteru objevila dříve, než jsme přistoupili k sekvenování.

Výsledky lze tedy shrnout následovně:

- a. Kultivačním testem jsme potvrdili dobrý růst *S. refuneus*, tvorbu vzdušného mycelia i sporulaci na BG půdě při 37 °C.
- b. Izolace chromozomální DNA *S. refuineus* probíhá způsobem zcela běžným pro organismy rodu *Streptomyces*.
- c. Provedené sekvenování ukázalo sekvenci typicky G +C bohatou.
- d. Zjištěné sekvence jsou prozatím 100% identické s dříve publikovanou sekvencí patentu WO02101051.
- e. Celý cluster pro biosyntézu anthramycinu je nyní k dispozici pro další výzkum.

Výsledky této práce jsou příspěvkem k první fázi v dlouhodobém procesu zajištění prevence rezistence *Plasmodium falciparum* na současná antimalarika, a to v tom smyslu, že se rozšiřují poznatky o možnostech produkce látek, jejichž struktura by byla terapeuticky účinná a bezpečná, a buď neumožnila vznik rezistence, nebo usnadnila produkci různých derivátů účinných látek v krátkém časovém období. Modifikace již existujících látek byla úspěšná už v případě klindamycinu a ukázala se být výhodná jak z medicínského, tak z ekonomického hlediska.

## Použitá literatura

- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.-Nucleic Acids Res.,1997, 25, pp. 3389-3402
- Arcamone F., Di Marco A., Gaetani M., Scotti T.** (1999): Isolation and antitumor activity of an antibiotic from Streptomyces. - Giorn. Microbiol., 1961, 9, p. 83-90.
- Arima et al.** (1972): J. Antibiotics. ,1972, 25, p. 437-444.
- Ausubel F.M. et al.** (1987): Current protocols in molecular biology 1987-1988.- New York : John Wiley and Sons (New York), 1987.
- Baltz.**10th International Symposium on the Genetics of Industrial Organisms.2006. -ustní sdělení
- Bednář B., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J.** (1999): Lékařská Mikrobiologie. - 1999, Marvil, Praha.
- Běhal V.** (2002): Antibiotics. - Biotechnology Annual Review., 2002, 8, p. 227-265.
- Bennett J.W.(1989):** Mycotoxin research. - Mycopathologia., 107, p. 65–66.
- Borrmann S., Lundgren I., Oyakhirome S., Impouma B., Matsiegui P., Adegnika A. A., Issifou S., Kun F.J.F., Hutchinson D.,Wiesner J., Jomaa H., Kremsner P.G.** (2006): Fosmidomycin plus Clindamycin for Treatment of Pediatric Patients Aged 1 to 14 Years with *Plasmodium falciparum* Malaria. - Antimicrobial Agents and Chemotherapy., Aug. 2006, Vol. 50, No. 8, p. 2713–2718.
- Brazhnikova M.G., Konstantinova N.V., Mesentsev A.S.** (1972): Sibiromycin: Isolation and characterization.- J. Antibiot., 1972, p. 668-673.
- Clyde D. F., Gilman R. H. ., McCarthy V. C** (1975): Antimalarial effects of clindamycin in man.- Am. J. Trop. Med. Hyg.,1975, 24, p. 369–370.
- Fichera M. E., Roos D.S.** (1997): **A plasmid organelle as a drug target in apicomplexan parasites.- Nature,1997, 390, p. 407–409.**
- Gatti G., Malena M., Casazza R., Borin M., Bassetti M., Cruciani M.** (1998): Penetration of Clindamycin and Its Metabolite N-Demethylclindamycin into Cerebrospinal Fluid following Intravenous Infusion of Clindamycin Phosphate in Patients with AIDS.- Antimicrobial Agents and Chemotherapy., Nov. 1998, p. 3014-3017.
- Gause G.F., Preobrazhenskaya T.P., Ivanitskaya L.P., Sveschnikova M.A.** (1969): Production of an antibiotic sibiromycin by *Streptosporangium sibiricum* sp. nov.- Antibiotiki, 1969,14, p.963-969.
- Gregson Stehen J., Howard Philips W., Barcella Simona, Nakamya Antonia, Jenkins Terence C., Kelland Lloyd R., Thurston David E.** (2000): Effect of C2/C3 – endo Unsaturation on the Cytotoxicity and DNA Binding Reaktivty of Pyrrolo [2,1-c][1,4] benzodiazepines.- Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 10., 2000, p. 1849 – 1854.
- Hara et al.** (1988): J. Antibiotics., 1988, 41, p. 702- 704.
- Havlík J.** (1990): Infektologie. - 2.vydání, 1990, p. 71, Avicenum, Praha.
- Hochlowski et al.** (1987): J. Antibiotics, 1987, 40, p. 145-148.
- Hurley, L. H.** (1977): Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antitumor antibiotics. Comparative aspects of anthramycin, tomamycin and sibiromycin.- J. Antibiot., 1977, 20, p. 349-370.
- Jelínková M.** (2000): Analýza genu LeuB z Corynebacterium glutamicum.- MS Dizertační práce, PFF UK. Praha.
- Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Turbachova I., Eberl,M., Zeidler,J.,Lichtenthaler H.K., Soldati D., Beck E.** (1999): **Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs.- Science, 1999, 285, p. 1573–1576.**
- Kaprálék F.** (1999): Základy bakteriologie.- Karolinum, 1999.
- Katzung , B.G.** (2001): Základní a klinická farmakologie. - 2.české vydání, 2001, p.885-887, H&H, Jinočany.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A.** (2000):Practical Streptomyces Genetics.- 2000, p. 3-23, The John Innes Foundation, Norwich.

- Konishi et al.** (1984): J. Antibiotics.-1984, 37, p. 200-206.
- Kopka M. L., Goodsell D. S., Baikalov I., Grzeskowiak K., Cascio D., Dickerson R. E.** (1994): Crystal structure of a covalent DNA-drug adduct: anthramycin bound to d(CCAACGTTGG)<sub>2</sub> and a molecular explanation of specificity.- Biochemistry., 1994, 33, p. 13593-13610.
- Kremsner P. G., Graninger W.** (1992): Clindamycin in the treatment of experimental and human malaria.- Rev. Contemp. Pharmacother., 1992, 3, p. 275-279.
- Kremsner P. G., Wildling E., Jenne L., Graninger W., Bienzle U.** (1994) Comparison of micronized halofantrine with chloroquine-antibiotic combinations for treating *Plasmodium falciparum* malaria in adults from Gabon.- Am. J. Trop. Med. Hyg., 1994, 50, p. 790-795.
- Kremsner P. G., Zotter, G.M., Feldmeier, H., Graninger, W., Rocha, R.M., Wiedermann, G.** (1998): A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated falciparum malaria in Acre, Brazil.- J. Infect. Dis., 1998, 158, p. 1368-1371.
- Kremsner, P. G.** (1990): Clindamycin in malaria treatment.- J. Antimicrob. Chemother., 1990, 25, p. 9-14.
- Květina.** Kurz farmaceutické medicíny. ACRO. 2006. - ustní sdělení
- Leblond P., Redenbach M. & Cullum J.** (1993): Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2).- J Bacteriol., 1993, 175, p. 3422-3429.
- Leimgruber W., Batcho A. D., Czajkowski R. C.** (1968): Total synthesis of Anthramycin.- J. Am. Chem. Soc., 1968, 90, p. 5641-5643.
- Leimgruber W., Batcho A.D., Czajkowski R.C.** (1968): Total synthesis of anthramycin.- J. Am. Chem. Soc., 1968, Sep 25, 90, p. 5641-3.
- Leimgruber W., Stefanovič V., Schenker F., Karr A., Berger J.** (1965): Isolation and Characterization of Anthramycin, a New Antitumour Antibiotic.- J. Am. Chem. Society., 1965, Dec 20th, p. 5791-5795.
- Lell, B., Kremsner, P.G.** (2002): Clindamycin as an Antimalarial Drug: Review of Clinical Trials.- Antimicrobial Agents and Chemotherapy., Aug. 2002., Vol. 46, No. 8, p. 2315 - 2320.
- Lewis, C.** (1968): J. Parasitol., 1968, 54, p. 169-170.
- Lezhava A. Mizukami T., Kajitani T., Kameoka D., Redenbach M., Shinkawa H., Nimi O., and Kinashi H.** (1995): Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*.- J Bacteriol., 1995, 177, p. 6492-6498.
- Lin Y.-S., Kieser H. M., Hopwood D. A. & Chen C. W.** (1993): The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear.- Mol Microbiol., 1993, 10, p. 923-933.
- Magerlein B.J., Kagan.** (1969): J. Med. Chem., 1969, 12, p. 780-784.
- Magerlein, B.J.** (1977): Modification of lincomycin, Structure - activity relationships among the semisynthetic antibiotic.- 1977, p. 600-651. Academic press, New York.
- Masterson L.A., Croker S.K., Jenkins T.C., Howard P.W., Thurston, D.E.** (2004): Synthesis and Biological Evaluation of Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines C8 Cyclic Amine Conjugates.- Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters., 2004, 14, 6, p. 1547 - 1549.
- Meszaros.** Kurz farmaceutické medicíny. ACRO. 2006. -ustní sdělení
- Peña M. R., Stille J.K.** (1989): J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, p. 5417.
- Pepper Christopher.J., Hambly Rachel M., Fegan Christopher D., Delavault P., Thurston David E.** (2004): The Novel Sequence-Specific DNA Cross- Linking Agent SJG-136 (NSC 694501) Has Potent and Selective In vitro Cytotoxicity in Human B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells with Evidence of a p53-Independent Mechanism of Cell Kill.- Cancer Research., 2004, 64, p. 6750-6755.
- Petrusek R.L., Uhlenhopp E.L., Duteau, N. Hurley, L.H.** (1982): Reaction of Anthramycin with DNA.- J. Biol. Chem., 1982, Vol. 257, No. 11, Issue of June 10, p. 6207-6216.
- Rahman, N. N.** (1969): Evaluation of the sensitivity in vitro of *Plasmodium falciparum* and in vivo of *Plasmodium chabaudi* malaria to various drugs and their combinations.- Med. J. Malaysia., 1977, 52, p. 390-398.



- Ramharter M., Oyakhirome S., Klouwenberg P.K., Adénika A. A., Agnandji S.T., Missinou M.A., Matsiégui P., Mordmüller B., Borrmann S., Kun J.F., Lell B., Krishna S., Graninger W., Issifou S., Kremsner P.G.** (2005): Artesunate-Clindamycin versus Quinine-Clindamycin in the Treatment of *Plasmodium falciparum* Malaria: A Randomized Controlled Trial.- *Clinical Infectious Diseases.*, 2005, 40, p. 1777–84.
- Restrepo A., Restrepo M., Baena C., Mejia B.E., Sossa P., Salazar M.E.** (1984): Tratamiento con clindamicina de la malaria por falciparum resistente.- *Acta Med. Col.*, 1984, 9, p. 15–21.
- Rokem J. Stefan, Hurley Laurence H.** (1981): Sensitivity and permeability of the anthramycin producing organism *Streptomyces refuineus* to anthramycin and structurally related antibiotics.- *J. Antibiot.*, 1981, 34, 9, p. 1171-1174.
- Rozenkranz H.S.** (1973): Aspects of Microbiology in Cancer Research.- *Annual Review of Microbiology.*, 1973, Vol. 27, p. 383 - 401.
- Sambrook S., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989): Molecular cloning : a laboratory manual . Vol. 1 / . - 2nd ed. - Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Seaberg L. S., Parquette A.R., Gluzman I.Y., Phillips G.W., Brodsky T.F., Krogstad D.J.** (1984): Clindamycin activity against chloroquineresistant *Plasmodium falciparum*.- *J. Infect. Dis.*, 1984, 150, p. 904–911.
- Shimizu et al.** (1982): *J. Antibiotics.*-1982, 29, p. 2492-2503.
- Sutherland C. J., Allouche A., Curtis J., Drakeley C.J., Ord R., Duraisingh M., Greenwood B.M., Pinder M., Warhurst D., and Targett G.A.** (2002): Gambian children successfully treated with chloroquine can harbor and transmit *Plasmodium falciparum* gametocytes carrying resistance genes.- *Am. J. Trop. Med., Hyg.* 2002, 67, p. 578–585.
- Šigutová L.** (2002): Acetolaktatsynthasa u *Streptomyces cinnamonensis*.- MS Diplomová práce, PřF UK. Praha.
- Takeuchi et al.** (1976): *J. Antibiotics.*, 1976, 29, p. 93-96.
- Tendler M. D., Korman. S.** (1963): *Nature.*, 1963, 199, p. 501, London.
- Thurston D. E., Bose D. S.** (1994): Synthesis and DNA-interactive pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines.- *Chem. Rev.*, 1994, 94, p. 433-465.
- Thurston D.E., Bose D.S., Howard P.V., Jenkins T.C., Leoni A., Baraldi P.G., Guiotto A., Cacciari B., Kelland L.R., Foloppe M., Rault S.** (1999): Effects of A-Ring Modifications on the DNA-Binding Behavior and Cytotoxicity of Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines.- *J. Med. Chem.*, 1999, 42, p. 1951 - 1964.
- Thurston, D. E.** (1903): Advances in the study of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine (PBD) antitumor antibiotics. In *Molecular aspects of anticancer drug-DNA interactions*, Neidle, S., Waring, M. J., Eds., MacMillan Press Ltd. U.K., 1993, Vol. 1, p. 54-88.
- Thurston, David E.** (1993): *Molecular Aspects of Anticancer Drug – DNA Interactions*, Neidle, S., Waring, M.J., Eds., Macmillan Press: UK, Vol 1, p 54.
- Tsunakawa, et al.** (1988): *J. Antibiotics.*, 1988, 41, p. 1366-1373.
- Volff J.N. a Altenbuchner J.** (1998): Genetic instability of *Streptomyces* chromosome.- *Mol. Microbiol.*, 1998, 27, p. 239-246.
- Wiesner J., Borrmann S., Jomaa H.** (2003): Fosmidomycin for the treatment of malaria.- *Parasitol. Res.*, 2003, 90(Suppl. 2), p. S71–S76.
- World Health Organization (WHO). Position of WHO's Roll Back Malaria Department on malaria treatment policy. Geneva: WHO, 2003.
- Zbinden, G.** (1964): *Proceedings of the International Symposium on the Chemotherapy of Cancer.*- Elsevier Publishing Co. Amsterdam., 1964, p. 303-310.
- Zimmer, C.** (1975): Effect of the antibiotics netropsin and distamycin A on the structure and function of nucleic acids.- *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1975, 15, p. 285-318.

[http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid\\_es-002/hesla/knihovna\\_genomova.html](http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/knihovna_genomova.html)

<http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm>

<http://www.doe-mbi.ucla.edu/People/Dickerson/Gallery/Anthramycin.html>

<http://www.fda.gov/Cber/blood/malaria071206sk.htm>

<http://v3.espacenet.com/origdoc?DB=EPODOC&IDX=WO02101051&F=0&RPN=WO02101051&DOC=deb45b02b9722ae199500cc48c46edbd64>

<http://www.freepatentsonline.com/4011140.html>

<http://www.freewebs.com/nectaroula/adduct.pdf>